

R. 7058

T/577 62

ROL

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Nutrición y Bormatología III

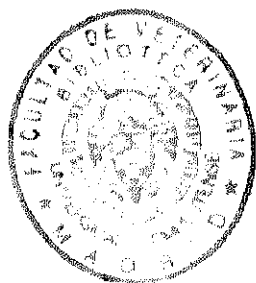
(Higiene y Tecnología de los Alimentos)

BIBLIOTECA UCM



530089970X

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
PARCIAL DE BACTERIAS LACTICAS DE
ORIGEN CARNICO ANTAGONISTAS DEL
DESARROLLO DE OTROS
MICROORGANISMOS**



Juan Miguel Rodríguez Gómez

Madrid, 1992

Colección Tesis Doctorales. N.º 205/92

© Juan Miguel Rodríguez Gómez

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía.
Escuela de Estomatología. Ciudad Universitaria.
Madrid, 1992.**

Ricoh 3700

Depósito Legal: M-25118-1992



La Tesis Doctoral de D. JUAN. HIGUEL.....
...RODRIGUEZ...GOMEZ.....
Titulada AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL
DE BACTERIAS LACTICAS DE ORIGEN CARNICO. ANTAGONISTAS
DEL DESARROLLO DE OTROS MICROORGANISMOS
Director Dr. D. PABLO HERNANDEZ CRUZA Y BERNABE JONZ
fue leida en la Facultad de VETERINARIA.....
de la UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, el día OCHO
de ..NOVIEMBRE..... de 1991., ante el tribunal
constituido por los siguientes Profesores:
PRESIDENTE .DÍMAS..FERNANDEZ..GALLAND.....
VOCAL PASCUAL...LOPEZ..LORENZO.....
VOCAL JUAN A...ORDÓÑEZ...PEREDA.....
VOCAL MIGUEL A...ASENSIO.....
SECRETARIO .ROSARIO MARTIN DE SANTOS.....
.....
habiendo recibido la calificación de .A.P.T.....
...CUM...LAUDE...POR...JUAN HIGUEL.....

Madrid, a 8 de NOVIEMBRE de 1991.
EL SECRETARIO DEL TRIBUNAL.

Chao Martín

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA III
(HIGIENE Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS)
FACULTAD DE VETERINARIA

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION
PARCIAL DE BACTERIAS LACTICAS DE
ORIGEN CARNICO ANTAGONISTAS DEL
DESARROLLO DE OTROS MICROORGANISMOS**

Memoria que para optar al grado
de Doctor en Veterinaria presenta
el licenciado:

Juan Miguel Rodríguez Gómez

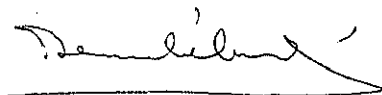
PABLO ELPIDIO HERNANDEZ CRUZA, CATEDRATICO DE NUTRICION Y BROMATOLOGIA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA:

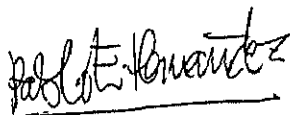
Que la tesis doctoral titulada "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION PARCIAL DE BACTERIAS LACTICAS DE ORIGEN CARNICO ANTAGONISTAS DEL DESARROLLO DE OTROS MICROORGANISMOS", de la que es autor D. Juan Miguel Rodríguez Gómez, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos), bajo la dirección conjunta del catedrático Dr. D. Bernabé Sanz Pérez y del catedrático que suscribe y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor en Veterinaria.

Madrid, 19 de Septiembre de 1991

El codirector



Fdo: B. Sanz Pérez



Fdo: Pablo E. Hernández Cruza

A mis padres

A José Carlos

A Manuela

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco al Prof. D. Bernabé Sanz Pérez la calurosa acogida en el Departamento que dirige y la confianza depositada en mí. Sus consejos y orientaciones han contribuido relevantemente en mi formación científica y personal.

De manera especial quiero mostrar mi agradecimiento al Prof. D. Pablo E. Hernández Cruza por haberme iniciado en el campo de la investigación. Su asesoramiento, ideas y apoyo han sido decisivos en la realización de este trabajo.

También quiero agradecer a los demás miembros del Departamento de Nutrición y Bromatología III su colaboración desinteresada y, muy particularmente, a Odón, cofundador del "Hogar del Lactobacilo" y compañero de las situaciones más inverosímiles que se presentan en un laboratorio; a Wagner y Fernanda, miembros asimismo del "Hogar"; a Almudena, paciente compañera de despacho y al Prof. D. José Tormo por su desinteresado interés durante la tramitación del cambio de Región Militar.

A Industrias Cárnicas Cabo, S.A. por su generosa colaboración al proporcionarnos las muestras de embutidos crudos curados, en todas las ocasiones en que fueron requeridas.

Al Departamento de Patología Animal I, especialmente a Mar Blanco, por la cesión de las cepas de *Listeria monocytogenes* así como por la información sobre los medios de cultivo para su desarrollo.

También quiero agradecer al personal del Departamento de Genética y Microbiología del AFRC Institute of Food Research (Norwich, Reino Unido), y especialmente a Mike Gasson, a Margret y a Harold, por las facilidades de todo tipo que me dieron durante mi estancia en dicho centro.

Al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de una Beca de Formación de Personal Investigador, con la que he realizado esta Tesis. Asimismo, este trabajo ha sido parcialmente subvencionado por el BRIDGE (Biotechnology Research for Innovation, Development and Growth in Europe) T-Project on Lactic Acid Bacteria (Contract BIOT-0263) y por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT ALI91-0255).

Por último, agradecer a mis padres, a mi hermano y a Manuela su incondicional apoyo en todo momento y en todos los sentidos, fundamental en el desarrollo de este trabajo.

INDICE

CAPITULO I: EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA

A INVESTIGAR	1
--------------------	---

CAPITULO II: REVISION BIBLIOGRAFICA 5

II. 1. - Las bacterias lácticas	6
---------------------------------------	---

1. 1. - Características generales	6
---	---

1. 2. - Taxonomía	8
-------------------------	---

II. 2. - El género <i>Lactobacillus</i>	12
---	----

2. 1. - Morfología	12
--------------------------	----

2. 2. - Pared y membrana celular	12
--	----

2. 3. - Características de las colonias	15
---	----

2. 4. - Nutrición y condiciones de cultivo	15
--	----

2. 5. - Metabolismo	16
---------------------------	----

2. 6. - Plásmidos	19
-------------------------	----

2. 7. - Estructura antigénica	19
-------------------------------------	----

2. 8. - Ecología	19
------------------------	----

2. 9. - Taxonomía	20
-------------------------	----

II. 3. - Grupo <i>Streptobacterium</i>	22
--	----

3. 1. - <i>Streptobacterias atípicas</i>	22
--	----

1. - <i>Lactobacillus sake</i>	23
--------------------------------------	----

2. - <i>Lactobacillus curvatus</i>	25
--	----

3. - <i>Lactobacillus bavaricus</i>	25
---	----

II. 4. - Las bacterias lácticas en la carne y productos cárnicos	28
--	----

II. 5. - Efectos beneficiosos de las bacterias lácticas en los alimentos	29
---	----

5. 1. - Extensión de la vida útil	29
5. 2. - Control de microorganismos patógenos	31
1. - Bacterias	31
2. - Virus	34
3. - Hongos y micotoxinas	35
5. 3. - <i>Trichinella spiralis</i>	35
5. 4. - Nitrosaminas	36
5. 5. - Aminas biógenas	37
II. 6. - Las bacterias lácticas como probióticos	39
6. 1. - Control de patógenos intestinales	41
6. 2. - Promoción del crecimiento de los animales	42
6. 3. - Prevención de la intolerancia a la lactosa	43
6. 4. - Tratamiento de la constipación intestinal	44
6. 5. - Actividad anticarcinogénica	45
6. 6. - Control de la colesterolemia	45
6. 7. - Estimulación de la inmunidad	47
II. 7. - Sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas	48
7. 1. - Ácidos orgánicos	48
7. 2. - Peróxido de hidrógeno	49
7. 3. - Diacetilo	51
7. 4. - Reuterina	51
7. 5. - Bacteriocinas	52
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS	59
III. 1. - MATERIALES	60
1. 1. - Material biológico	60
1. - Microorganismos empleados	60

2. - Determinación del ácido láctico, enzimas y controles proteicos	60
3. - Productos y reactivos	61
1 2. - Material de laboratorio	61
III 2. - METODOS	66
2 1. - Medios de cultivo empleados en el crecimiento de los microorganismos	66
1. - Medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias lácticas	67
2. - Medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos indicadores distintos a las bacterias lácticas	68
3. - Medio para cultivos mixtos de bacterias lácticas y microorganismos psicrotrofos patógenos	69
4. - Medio de cultivo para el crecimiento selectivo de <i>Yersinia enterocolitica</i>	70
5. - Medio de cultivo para el crecimiento selectivo de <i>Listeria monocytogenes</i>	71
2 2. - Aislamiento y selección de bacterias lácticas de los embutidos crudos curados	72
2 3. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas	73
1. - Soluciones tampón empleadas	73
2. - Pruebas directas de antagonismo	75
1. Prueba directa de antagonismo en pocillos	75
2. Prueba directa de antagonismo por siembra en picadura	76
3. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células	76

1. Preparación de los sobrenadantes	76
2. Detección de la actividad inhibidora de los sobrenadantes	77
4. - Actividad inhibidora de los extractos de los medios de cultivo sólidos en los que se desarrollaron las bacterias lácticas seleccionadas	77
5. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas	78
6. - Determinación del peróxido de hidrógeno de los medios de cultivo	78
2. 4. - Identificación y caracterización bioquímica de algunas bacterias lácticas con actividad antimicrobiana	79
1. - Morfología y tinción por el método de Gram	79
2. - Prueba de la catalasa	79
3. - Producción de gas a partir de glucosa	80
4. - Hidrólisis de la arginina	81
5. - Producción de ácido sulfhídrico	83
6. - Prueba de Voges-Proskauer	84
7. - Fermentación de carbohidratos	85
8. - Tolerancia al NaCl	86
9. - Tolerancia al pH 3,9	86
2. 5. - Crecimiento y cinética del desarrollo de las bacterias lácticas seleccionadas a diversas temperaturas	87
1. - Crecimiento de los cultivos	87
2. - Parámetros cinéticos del desarrollo microbiano	87
1. Velocidad específica de crecimiento (μ)	87
2. Tiempo de duplicación	89
3. Número de generaciones por hora (g/h)	89

2. 6. - Síntesis de metabolitos finales	89
1. - Determinación de los ácidos L(+) y D(-)-láctico	89
2. - Determinación de diacetilo/acetoína	91
2. 7. - Identificación y curado de plásmidos de algunos lactobacilos con actividad antimicrobiana	92
1. - Identificación de plásmidos	92
1. - Tampones, soluciones y geles empleados	93
2. - Lisis celular por el método de Chassy	95
3. - Aislamiento del DNA plasmídico por el método de Currier y Nester.....	96
4. - Purificación del DNA plasmídico mediante centrifugación hasta el equilibrio en gradientes de CsCl-BrEt	97
5. - Técnica miniaturizada y rápida de aislamiento de DNA plasmídico	99
6. - Visualización del DNA plasmídico por electroforesis en geles de agarosa	100
2. - Curado o eliminación de plásmidos.....	102
2. 8. - Antagonismo de los cultivos mixtos de <i>L. sake</i> 23 y <i>L.</i> <i>sake</i> 148 con microorganismos psicotrofos productores de toxoinfecciones alimentarias.....	103
1. - Siembra de los microorganismos	103
2. - Análisis microbiológicos y bioquímicos	103
2. 9. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 449	104
1. - Efecto de enzimas proteolíticos en la actividad inhibidora de <i>L. sake</i> 449	104

2. - Cinética de termodestrucción de la actividad	
Inhibidor de <i>L. sake</i> 449	105
1. - Tratamiento térmico	105
2. - Parámetros cinéticos de termodestrucción	105
A. Valor "D"	105
B. $t_{1/2}$	106
C. Valor "Z"	108
3. - Efecto del medio de cultivo en la actividad inhibidora	
de <i>L. sake</i> 449	109
4. - Mecanismo de acción de la sustancia inhibidora	
producida por <i>L. sake</i> 449	110
2. 10. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana	
exocelular de <i>L. sake</i> 449	111
1. - Cromatografía de filtración en geles	111
1. - Soluciones tampón empleadas	111
2. - Geles	112
3. - Condiciones de trabajo	112
2. - Determinación de la proteína	113
3. - Determinación del peso molecular de la sustancia	
inhibidora por cromatografía de filtración en Sephadex	
G-50	116
2. 11. - Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil	
sulfato sódico (SDS-PAGE)	116
1.- Técnica de Swank y Munkres (1971)	118
1. - Tampones, geles y soluciones empleadas	118
2. - Preparación de las muestras	120
3. - Preparación de los geles	120
4. - Electroforesis	121

5. - Tinción de los geles	121
6. - Determinación del peso molecular	121
2. - Técnica de Laemmli (1970)	122
1. - Tampones, geles y soluciones empleadas	122
2. - Preparación de las muestras	125
3. - Preparación de los geles y electroforesis	125
4. - Tinción de los geles	125
5. - Determinación del peso molecular	125
2. 12. - Concentración inhibidora mínima de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada en diversos microorganismos indicadores	126
CAPITULO IV: RESULTADOS	127
IV. 1. - Aislamiento y selección de bacterias lácticas	128
IV. 2. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas	128
2. 1. - Actividad inhibidora directa	128
2. 2. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células	130
2. 3. - Actividad inhibidora de los extractos de los medios sólidos en los que se desarrollaron las bacterias lácticas seleccionadas	130
2. 4. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas	142
2. 5. - Determinación del peróxido de hidrógeno de los medios de cultivo	142
IV. 3. - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas seleccionadas	144

3. 1. - Morfología y tinción por el método de Gram	146
3. 2. - Prueba de la catalasa	146
3. 3. - Producción de CO ₂	146
3. 4. - Hidrólisis de la arginina	146
3. 5. - Producción de ácido sulfhídrico	146
3. 6. - Prueba de Voges-Proskauer	147
3. 7. - Fermentación de carbohidratos	147
3. 8. - Tolerancia al NaCl	148
3. 9. - Tolerancia al pH 3,9	153
IV. 4. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de <i>L. sake</i> a diversas temperaturas	153
IV. 5. - Síntesis y cinética de producción de metabolitos finales	159
5. 1. - Ácidos L(+) láctico y D(-) láctico	159
5. 2. - Producción de diacetilo/acetolína.....	159
IV. 6. - Identificación y curado de los plásmidos de algunas cepas de <i>L. sake</i> con actividad inhibidora en sus sobrenadantes concentrados de sus cultivos líquidos	165
6. 1. - Visualización de los plásmidos	165
6. 2. - Curado de los plásmidos	167
IV. 7. - Actividad inhibidora de los cultivos mixtos de <i>L. sake</i> 23 y <i>L. sake</i> 148 frente a microorganismos psicrotrofos productores de toxoinfecciones alimentarias	173
7. 1. - Inhibición de <i>Y. enterocolitica</i>	173
7. 2. - Inhibición de <i>List. monocytogenes</i>	180
IV. 8. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 449	188

8. 1. - Efecto de diversos enzimas proteolíticos en la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de <i>L. sake</i> 449	188
8. 2. - Termorresistencia de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de <i>L. sake</i> 449	188
8. 3. - Determinación de la actividad antimicrobiana de <i>L. sake</i> 449 en diversos medios de cultivo	190
8. 4. - Mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 449	193
IV. 9. - Purificación de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 449	193
9. 1. - Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-50	200
IV. 10. - Determinación del peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilo sulfato sódico	200
IV. 11. - Concentración inhibidora mínima de la sustancia antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 449	204
CAPITULO V: DISCUSION	206
V. 1. - Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos madurados	207
V. 2. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas	208
2. 1. - Elección de las pruebas de antagonismo microbiano	208
1. - Pruebas directas de antagonismo microbiano	208
2. - Antagonismo de los sobrenadantes libres de células	210

2. 2. - Actividad inhibidora de los cultivos de las bacterias lácticas seleccionadas	213
2. 3. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células	215
2. 4. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas	216
V. 3. - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana	217
V. 4. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de <i>L. sake</i> a diversas temperaturas	222
V. 5. - Síntesis y cinética de producción de metabolitos finales	224
5. 1. - Ácidos L(+) láctico y D(-) láctico	224
5. 2. - Diacetilo/acetoina	227
V. 6. - Identificación y curado de los plásmidos de diversas cepas de <i>L. sake</i>	227
V. 7. - Actividad inhibidora de los cultivos mixtos de <i>L. sake</i> 23 y <i>L. sake</i> 148 con microorganismos psicrófilos productores de toxoinfecciones alimentarias	235
7. 1. - Inhibición de <i>Yersinia enterocolitica</i>	238
7. 2. - Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i>	242
V. 8. - Caracterización y purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de <i>L. sake</i> 449	248
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	254
CAPITULO VII: TRABAJO FUTURO	258
CAPITULO VIII: BIBLIOGRAFÍA	261

CAPITULO 1

EXPOSICION GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

La utilización de bacterias lácticas como cultivos iniciadores en la obtención de embutidos crudos curados, o como factores de seguridad para incrementar la calidad higiénica y la vida útil de la carne y de diversos productos cárnicos, constituye una práctica cada vez más habitual en la industria cárnica. No obstante, todavía es corriente, en muchos casos, la utilización de bacterias lácticas, no bien caracterizadas, o aisladas de alimentos distintos a aquéllos en los que se pretenden emplear.

La masificación de los medios de producción y la conveniencia de garantizar la calidad higiénica de los alimentos cárnicos, sin recurrir para ello al empleo de conservadores de naturaleza química, exige el conocer los mecanismos por los que las bacterias lácticas inhiben el desarrollo de los microorganismos alterantes y patógenos, potencialmente presentes en la carne y productos cárnicos.

En las bacterias lácticas, la síntesis de ácidos orgánicos y su efecto en el descenso del pH, se han considerado tradicionalmente como los mecanismos responsables de su actividad inhibidora. No obstante, se sabe que estas bacterias producen otras sustancias antimicrobianas, entre las que se incluyen el peróxido de hidrógeno, la acetoina/diacetilo y las bacteriocinas. Las últimas se definen como sustancias antimicrobianas, de naturaleza proteica, con actividad bactericida, cuya producción por las bacterias lácticas de origen cárnico ha sido, hasta hace poco tiempo, infravalorada.

Por todo ello, en este trabajo se propone el aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos curados y la posterior caracterización parcial de aquellas que muestren mayor actividad inhibidora en los microorganismos indicadores empleados. Las bacterias lácticas seleccionadas se someterán a

una identificación y caracterización bioquímica parcial, evaluando sus parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de metabolitos finales, especialmente de aquéllos que puedan tener una mayor relevancia en la actividad antimicrobiana de dichas bacterias. De especial interés es la detección de la producción de sustancias antimicrobianas exocelulares en las bacterias lácticas seleccionadas, lo que conducirá a determinar su espectro antimicrobiano, así como a intentar su purificación y caracterización parcial empleando técnicas bioquímicas estándar. Las sustancias antagonistas de naturaleza proteica, una vez caracterizadas y purificadas podrían emplearse en un futuro próximo, junto o independientemente con el microorganismo productor, como factores de seguridad para incrementar la calidad higiénica de la carne y de sus productos.

También es interesante determinar, si la producción de bacteriocinas está ligada a la presencia de elementos genéticos extracromosomales, como los plásmidos, ya que de ser así, los genes con dicha actividad fácilmente localizables y manipulables, constituirían un excelente marcador genético en experiencias futuras de transferencia genética y de expresión de funciones metabólicas de interés en diversas bacterias lácticas.

Asimismo, se ha determinado que la carne y los productos cárnicos son portadores de cepas patógenas de *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*, que por su patogenicidad y su carácter psicrotrófo conviene eliminar o reducir en los alimentos. La utilización de bacterias lácticas o de bacteriocinas, que destruyan o disminuyan la presencia de las patógenas, constituye, en los alimentos, una medida de control adecuada. Por ello, en este trabajo también se hace un breve estudio de la actividad inhibidora que ciertas bacterias lácticas seleccionadas ejercen sobre los microorganismos

patógenos citados.

Así pues, para lograr nuestros objetivos se ha propuesto el desarrollo del programa de trabajo que se describe a continuación:

1.- Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos curados y, selección de aquéllas, que manifiesten una actividad inhibidora máxima en los microorganismos indicadores elegidos.

2.- Evaluación de los mecanismos implicados en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas.

3.- Identificación morfológica y caracterización bioquímica de dichas bacterias y, evaluación de sus parámetros cinéticos de crecimiento y de producción de metabolitos finales.

4.- Caracterización bioquímica parcial y purificación de las sustancias antimicrobianas exocelulares de naturaleza proteica, antagonistas del desarrollo de microorganismos productores de toxoinfecciones alimentarias.

5.- En las bacterias lácticas de interés, identificar la presencia de plásmidos y evaluar la posible relación existente entre la presencia de los mismos y la síntesis de sustancias antimicrobianas exocelulares.

6.- Evaluar, mediante el empleo de cultivos mixtos, la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas frente a *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*, dos bacterias patógenas psicrótrofas de gran interés en la industria cárnica.

CAPITULO II

REVISION

BIBLIOGRAFICA

II. 1. - LAS BACTERIAS LÁCTICAS

II. 1. 1. - Características generales.

El término "bacterias lácticas" se aplica a diversos microorganismos cuya característica común es su capacidad de producir ácido láctico como producto final de la fermentación de los carbohidratos. Este término lo utilizó por primera vez Huetpe (1884), al llamar "Milchsäuerbazillus" a la flora microbiana responsable de la acidificación y coagulación de la leche. Desde entonces, las bacterias lácticas se han aislado de un gran número de fuentes incluyendo, además de la leche y sus derivados, las carnes y productos cárnicos, productos vegetales, vinos, encurtidos e intestino, cavidad oral y vagina de muchas especies animales (London, 1976).

El grupo se compone de cocos, cocobacilos y bacilos Gram positivos, no esporulados, microaerofílicos, catalasa negativos, inmóviles y no reductores de los nitratos (Sharpe, 1979). Sin embargo, estas características, a excepción de la tinción de Gram, están en constante discusión, posiblemente debido a que muchas propiedades comunes de este grupo derivan, en alguna medida, del empleo de un número reducido de medios selectivos, de la excesiva especialización de los medios de cultivo y de la arbitrariedad en la elección de las pruebas de identificación de las cepas (Ingram, 1975). Asimismo, y especialmente en comparación con las bacterias lácticas de origen lácteo, se han realizado pocos estudios sobre las propiedades de las bacterias lácticas de otras procedencias (p.e. de carne y productos cárnicos), habiéndose asumido para estas últimas y, en muchos casos de forma errónea, las mismas características de las primeras (Egan, 1983).

Las bacterias lácticas se admite que no producen endosporas. Sin

embargo, algunos investigadores han citado la presencia de esporas en lactobacilos aparentemente típicos (Thornley y Sharpe, 1959; Nakayama, 1960; Kitahara y Suzuki, 1963). Es de destacar que, en todos los casos, las esporas se producían en medios de cultivo con cantidades muy pequeñas de carbohidratos, lo que dificultaba el desarrollo microbiano. A este respecto, se ha sugerido que el uso generalizado de medios de cultivo con altas concentraciones de carbohidratos, podría impedir la formación de endosporas en cepas con dicha propiedad (Kitahara y Suzuki, 1963).

El carácter microaerofílico de las bacterias lácticas es también variable, si bien ciertas especies necesitan condiciones aeróbicas estrictas para desarrollarse en determinados sustratos (Whittenbury, 1963). Las diferencias en esta necesidad son especialmente numerosas entre los lactobacilos heterofermentativos y en las especies del género *Leuconostoc* (Ingram, 1975).

Aunque las bacterias lácticas son característicamente catalasa negativas, muchas cepas de los géneros *Pedilococcus* y *Lactobacillus* producen una "pseudocatalasa" que descompone el peróxido de hidrógeno, pero que difiere de la catalasa en que no contiene hemo como grupo prostético y en que es insensible al cianuro y a la azida de sodio (Dacre y Sharpe, 1956; Whittenbury, 1964; Johnston y Delviche, 1965; Kandler y Weiss, 1986). No obstante, cuando el medio dispone de compuestos hemo, ciertas bacterias lácticas pueden, incluso, producir una verdadera catalasa sensible a las dos sustancias citadas (Whittenbury, 1964). De hecho, algunas bacterias lácticas tienen la capacidad de sintetizar la apocatalasa pero no el grupo prostético (Ingram, 1975). Recientemente, Hastings y Holzapfel (1987) han observado la presencia de una pseudocatalasa en 100 cepas de *L. sake* aisladas de carne radurizada.

Las bacterias lácticas se consideran microorganismos inmóviles. Sin embargo, también se han aislado y descrito cepas móviles, generalmente de fuentes distintas a la leche y sus derivados (Mann y Oxford, 1954; Vankova, 1957; Deibel y Niven, 1958). Entre las especies móviles se encuentran *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus* y *Lactobacillus ruminis* (Stamer, 1979).

Asimismo, se ha sostenido hasta muy recientemente que las bacterias lácticas no reducen los nitratos, por ello no se ha considerado la posibilidad de que lo hiciesen durante, por ejemplo, la maduración de los embutidos. Esto puede deberse a que, tradicionalmente, la reducción de los nitratos no se ha admitido como rasgo importante en la caracterización de las bacterias lácticas (Sharpe y col., 1966). Rogosa (1961) observó que en muchos casos esta propiedad, aunque presente, se inhibe por la acidez desarrollada cuando el medio de cultivo contiene concentraciones elevadas de glucosa; dicho investigador sugirió emplear un 0.1 % de glucosa en vez del 2 % habitual para la realización de esta prueba. Empleando esta modificación, Spencer (1969) y Dempster (1972) observaron que varias cepas aisladas de carnes frescas eran nitrato-reductoras. Ingram (1975), también ha señalado que la mayor parte de las bacterias lácticas aisladas de carnes curadas reducen los nitratos y se ha observado que *L. plantarum* posee dicha capacidad (Smith y Palumbo, 1978).

II. 1. 2. - Taxonomía.

La clasificación de las bacterias lácticas está en continua evolución, lo que origina expansiones y contracciones periódicas de la taxonomía de este grupo bacteriano. Afortunadamente, las líneas maestras resultantes de las

investigaciones pioneras de Orla-Jensen (1919), todavía proporcionan criterios racionales para la identificación y clasificación de las bacterias lácticas. Utilizando ciertas propiedades, como carbohidratos fermentados, temperaturas óptimas de crecimiento, productos finales de la fermentación y el isómero óptico del ácido láctico producido, Orla-Jensen agrupó a las bacterias lácticas en los géneros *Betacoccus*, *Streptococcus*, *Tetracoccus*, *Betabacterium*, *Streptobacterium* y *Thermobacterium*. De estos seis géneros sólo uno, el *Streptococcus*, ha conservado su rango taxonómico. Los géneros *Betacoccus* y *Tetracoccus* han sido sustituidos, respectivamente, por los de *Leuconostoc* y *Pediococcus* mientras que los géneros *Betabacterium*, *Thermobacterium* y *Streptobacterium* se consideran subgéneros del género *Lactobacillus* (Tabla II. 1).

Tradicionalmente, las bacterias lácticas se han dividido en dos grandes grupos de acuerdo con los productos finales que producen al fermentar la glucosa. Las especies que producían fundamentalmente ácido láctico se denominaron homofermentativas, mientras que las especies que producían una mezcla de productos finales (lactato, acetato o etanol, CO_2) se denominaron heterofermentativas (Tabla II. 1).

Con el desarrollo de técnicas bioquímicas más sofisticadas se ha comprobado que la distinción entre bacterias lácticas homo y heterofermentativas reside en los enzimas asociados con la fermentación de la glucosa. De esta manera, Buyze y col., (1957) dividieron las bacterias lácticas en tres grupos fisiológicos diferentes: 1.) heterofermentadores obligados, que poseen los enzimas glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa, pero no fructosa difosfato aldolasa, 2.) homofermentadores obligados, que carecen de las dos deshidrogenasas pero poseen aldolasa, y 3.) heterofermentadores facultativos, que aunque poseen

las deshidrogenasas degradan la glucosa preferentemente como los homofermentadores obligados.

Lo antes expuesto indica que la taxonomía de las bacterias lácticas deriva fundamentalmente del estudio de sus propiedades bioquímicas y fisiológicas. El empleo de tales criterios implica aceptar que las similitudes bioquímicas y fisiológicas reflejan estrechas afinidades naturales entre los microorganismos, como de hecho sucede en muchos casos. Sin embargo, la utilización en los últimos años de las nuevas técnicas bioquímicas y de biología molecular aplicadas al estudio de las bacterias lácticas, como la determinación de la estructura y composición química de las paredes y membranas celulares y la homología DNA-DNA y DNA-RNA, así como la determinación de los porcentajes de guanina más citosina en el DNA y la regulación enzimática de la glicólisis, han clarificado mucho mejor tales relaciones taxonómicas, concluyéndose que los géneros *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* y *Lactobacillus* forman parte del mismo grupo filogenético (London, 1976).

No obstante, recientemente los enterococos del grupo serológico D se han excluido del grupo de las bacterias lácticas (Schleifer y Kilpe-Balç, 1984), mientras que los estreptococos del grupo serológico N se han transferido al género *Lactococcus* (Schleifer y col., 1985). *Lactobacillus divergens* y *Lactobacillus carnis* también se han reclasificado como miembros de un nuevo género, denominado *Carnobacterium* (Collins y col., 1987).

Tabla II. 1. Tipos de fermentación y productos finales de los géneros microbianos que integran el grupo de las bacterias lácticas.

Género	Tipo de fermentación	Producto final mayoritario	Configuración del lactato
<i>Streptococcus</i> (<i>Lactococcus</i>)	Homofermentativa	lactato	L (+)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativa	lactato	DL, L (+)
<i>Lactobacillus</i>			
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentativa	lactato	D (-), L (+), DL
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentativa	lactato	D (-), L (+), DL
	Heterofermentativa (1)	lactato:acetato (1:1)	D (-), L (+), DL
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentativa	lactato:acetato:CO ₂ (1:1:1)	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativa	lactato:acetato:CO ₂ (1:1:1)	D (-)

(1) Utilización de pentosas.

Fuente: Kandier (1983).

II. 2. - EL GÉNERO *LACTOBACILLUS*

II. 2. 1. - Morfología.

El género *Lactobacillus* comprende aproximadamente unas 40 especies muy diferentes entre sí, que varían, desde bacilos largos, hasta cocobacilos tan cortos, que pueden confundirse con miembros de los géneros *Leuconostoc* o *Lactococcus*. La longitud de los bacilos y su curvatura dependen de la edad de los cultivos, de la composición del medio de cultivo y de la tensión del oxígeno disuelto. La división celular se produce únicamente en un plano y la tendencia a formar cadenas varía entre las diversas especies e incluso entre cepas de la misma especie, dependiendo de la fase de crecimiento y del pH del medio. Los lactobacilos son microorganismos Gram-positivos, que presentan a veces, especialmente los homofermentativos, granulaciones internas.

II. 2. 2. - Pared y membrana celular.

El peptidoglicano de la pared celular de los lactobacilos es muy variado (Tabla II. 2), siendo el más extendido el que contiene los aminoácidos Lys-D-Asp (Schleifer y Kandler, 1972). La pared celular también contiene polisacáridos unidos al peptidoglicano por enlaces fosfodiéster (Knox y Hall, 1964) y todas las especies poseen ácidos teicoicos en sus membranas (Archibald y Baddiley, 1966). Asimismo se observa la presencia de mesosomas grandes formados por invaginaciones de la membrana citoplasmática.

Tabla II. 2. Subdivisión y algunas características del género *Lactobacillus*

Grupo	Genotipo	Especie	% G + C	Tipo de peptidoglicano	Grupo antigénico	Isómero del ác. láctico
I. Homof. oblig.	1	<i>L. delbrueckii</i>				
		ssp. <i>delbrueckii</i>	49-51	L-Lys-D-Asp	E	D
		ssp. <i>bulgaricus</i>	49-51	D-Lys-D-Asp	E	D
		ssp. <i>lactis</i>	49-51	L-Lys-D-Asp	E	D
	2	<i>L. acidophilus</i>	34-56	D-Lys-D-Asp		DL
	3	<i>L. casei</i>	33-35	L-Lys-D-Asp		DL
	4	<i>L. jensenii</i>	33-37	L-Lys-D-Asp		D
	5	<i>L. crispatus</i>	35-37	L-Lys-D-Asp		DL
	6	<i>L. helveticus</i>	38-40	L-Lys-D-Asp	A	DL
	7	<i>L. amilophilus</i>	44-46	L-Lys-D-Asp		L
	8	<i>L. salivarius</i>	34-36	L-Lys-D-Asp	G	L
	9	<i>L. farciminius</i>	34-36	L-Lys-D-Asp		L
	10	<i>L. sharpae</i>	52-53	meso-DAP		L
II. Heterof. facultat.	1a	<i>L. casei</i>				
		ssp. <i>casei</i>	45-47	L-Lys-D-Asp	BC	L
		ssp. <i>pseudophantarum</i>	45-47	L-Lys-D-Asp	BC	DL
		ssp. <i>tolerans</i>	45-47	L-Lys-D-Asp	BC	L
	1b	<i>L. casei</i>				
		ssp. <i>rhombosus</i>	45-47	L-Lys-D-Asp	BC	L
		ssp. <i>fusiformis</i>	45-47	L-Lys-D-Asp	BC	L
	2	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i>	42-44	L-Lys-D-Asp		DL
	3	<i>L. devaricus</i>	42-44	L-Lys-D-Asp		L
		<i>L. murinus</i>	42-44	L-Lys-D-Asp		L

Tabla II. 2. - (continuación)

Grupo	Genotipo	Especie	% O + C	Tipo de peptidoglicano	Grupo antigénico	Isómero del ác. láctico
II. Heterof.	4	<i>L. alimentarius</i>	35-37	L-Lys-D-Asp		L
	5	<i>L. coryneformis</i>	45-47	L-Lys-D-Asp		D
	6	<i>L. homohispidus</i>	35-37	L-Lys-D-Asp		DL
	7	<i>L. maltaromicus</i>	35-37	meso-DAP		L
	8	<i>L. plantarum</i>	44-46	meso-DAP	D	DL
	9	<i>L. agilis</i>	42-44	meso-DAP		L
III. Heterof. oblig.	1	<i>L. bifarmicans</i>	44-46	L-Lys-D-Asp		DL
	2	<i>L. brevis</i>	45-47	L-Lys-D-Asp	E	DL
	3	<i>L. buchneri</i>	44-46	L-Lys-D-Asp	E	DL
	4	<i>L. collinoides</i>	45-47	L-Lys-D-Asp		DL
	5	<i>L. fructivorans</i>	38-40	L-Lys-D-Asp		DL
	6	<i>L. hilgardii</i>	39-41	L-Lys-D-Asp		DL
	7	<i>L. kefir</i>	40-42	L-Lys-D-Asp		DL
	8	<i>L. roulei</i>	40-42	L-Lys-D-Asp		DL
	9	<i>C. divergens</i>	33-35	meso-DAP		DL
	10	<i>L. vaccinostercus</i>	35-37	meso-DAP		DL
	11	<i>L. fermentum</i>	52-54	L-Orn-D-Asp	F	DL
	12	<i>L. confusus</i>	45-47	L-Lys-L-Ala		DL
	13	<i>L. fructosus</i>	45-47	L-Lys-L-Ala		D
	14	<i>L. halotolerans</i>	45-47	L-Lys-L-Ala-L-Ser		DL
	15	<i>L. viridescens</i>	45-47	L-Lys-L-Ala-L-Ser		DL
	16	<i>L. minor</i>	45-47	L-Lys-L-Ala-Glu-L-Ala		DL
	17	<i>L. kandleri</i>	38-40	L-Lys-L-Ala-Glu-L-Ala		DL
	18	<i>L. sanfrancisco</i>	36-38	L-Lys-L-Ala		DL

Homoef. oblig.: Homofermentadores obligados; Heterof. facultat.: Heterofermentadores facultativos;

Heterof. oblig.: Heterofermentadores obligados.

Fuente: Bottazzi (1988)

II. 2. 3. - Características de las colonias.

En medios sólidos, las colonias suelen ser normalmente pequeñas (2-5 mm), con márgenes enteros, convexas, lisas, brillantes y opacas. En los que contienen proteínas o lípidos dispersos no suelen observarse halos de hidrólisis alrededor de las colonias. No obstante, la mayoría de las cepas exhiben una ligera actividad proteolítica, debida a proteasas y peptidasas de la pared celular, y una débil actividad lipolítica debida, sobre todo, a lipasas intracelulares (Law y Kolstad, 1983).

II. 2. 4. - Nutrición y condiciones de cultivo.

Los lactobacilos son organismos extremadamente exigentes, adaptados a sustratos orgánicos complejos. Para desarrollarse no sólo requieren carbohidratos, sino también nucleótidos, aminoácidos y vitaminas. Mientras todas las especies requieren ácido pantoténico y nicotínico, la tiamina sólo es necesaria para el crecimiento de los lactobacilos heterofermentativos. Las necesidades de ácido fólico, riboflavina, fosfato de piridoxal y ácido *p*-aminobenzoico son variables entre las distintas especies, siendo la riboflavina el compuesto más comunmente requerido. La biotina y la vitamina B₁₂ sólo son necesarias para un número escaso de cepas. Los resultados de Morishita y col. (1974; 1981) indican que muchos requerimientos nutricionales de los lactobacilos podrían deberse a la acumulación de mutaciones en su genoma.

Los diferentes nutrientes esenciales requeridos para el desarrollo de los lactobacilos se encuentran, normalmente, en sus medios ordinarios de cultivo que contienen, además de carbohidratos fermentables, peptona, extractos cárnicos y extracto de levadura. Las suplementaciones con jugo de tomate,

manganeso y ésteres del ácido oleico (especialmente Tween 80) en muchas especies son estimulantes y a veces incluso esenciales.

Los lactobacilos crecen bien en medios ligeramente acidificados, con un pH inicial de 4.5-6.4. El crecimiento cesa cuando el pH alcanza valores de 3.6-4.0, dependiendo de la especie y cepa. Aunque la mayoría de las cepas son aerotolerantes, su desarrollo óptimo se consigue bajo microaerofilia o anaerobiosis, estimulando su crecimiento concentraciones de CO_2 de alrededor del 5 %. La mayoría de los lactobacilos crecen óptimamente a temperaturas mesofílicas de no más de 40 °C. Algunas especies crecen por debajo de 15 °C y otras por debajo de 5 °C. Los lactobacilos denominados "termofílicos" se desarrollan a 55 °C y no lo hacen a 15 °C.

II. 2. 5. - Metabolismo.

Metabólicamente, los lactobacilos se encuentran en el umbral entre la vida aeróbica y la anaeróbica; poseen rutas metabólicas eficientes de fermentación de los carbohidratos, acopladas con sistemas de fosforilación a nivel de sustrato. Las principales rutas metabólicas de utilización de las hexosas son las de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis) en la que un mol de hexosa se convierte en dos de ácido láctico (fermentación homoláctica) y la del 6-P-gluconato en la que un mol de hexosa origina un mol de CO_2 , uno de etanol (o ácido acético) y otro de ácido láctico (fermentación heteroláctica) (Figura 2. 1). El piruvato, producto intermediario de ambas rutas metabólicas, puede sufrir otras conversiones alternativas, originando diacetilo y sus derivados o ácido acético.

A nivel enzimático, los lactobacilos homo y heterofermentativos

difieren respecto de la presencia de una aldolasa y fosfocetolasa. Mientras que los homofermentativos poseen únicamente la aldolasa, los heterofermentativos sólo disponen de fosfocetolasa, por lo que también utilizan las pentosas, produciendo cantidades equimolares de ácidos láctico y acético. No obstante, un grupo de lactobacilos homofermentativos, tradicionalmente conocidos como estreptobacterias, poseen una fosfocetolasa inducible, siendo las pentosas las inductoras de la síntesis de este enzima. Por ello estos microorganismos utilizan las pentosas con formación de ácidos láctico y acético, y las hexosas con formación de ácido láctico únicamente.

La configuración L o D del ácido láctico formado depende de la estereoespecificidad de la lactato deshidrogenasa que poseen los lactobacilos; la forma racémica se produce cuando en la misma célula hay tanto L- como D-lactato deshidrogenasa. No obstante, *L. sake*, *L. curvatus* y *L. casei* subsp. *pseudopiantarum* producen el correspondiente racemato por la acción de una lactato racemasa inducible que actúa en combinación con una L-lactato deshidrogenasa constitutiva (Sletter y Kandler, 1973). Las lactato deshidrogenasas de las diferentes especies difieren a menudo considerablemente en su movilidad electroforética y en otras características bioquímicas. La mayoría de estas enzimas no son alostéricas pero algunas especies (*L. casei*, *L. sake*, *L. curvatus* y *L. bavaricus*) contienen L-lactato deshidrogenasas alostéricas siendo sus efectores la fructosa difosfato y el Mn^{2+} (Hensel y col., 1977).

En la actualidad se dispone de poca información sobre los mecanismos de transporte de azúcares en las especies del género *Lactobacillus* a pesar de que la presencia o ausencia de dichos mecanismos determina el patrón de

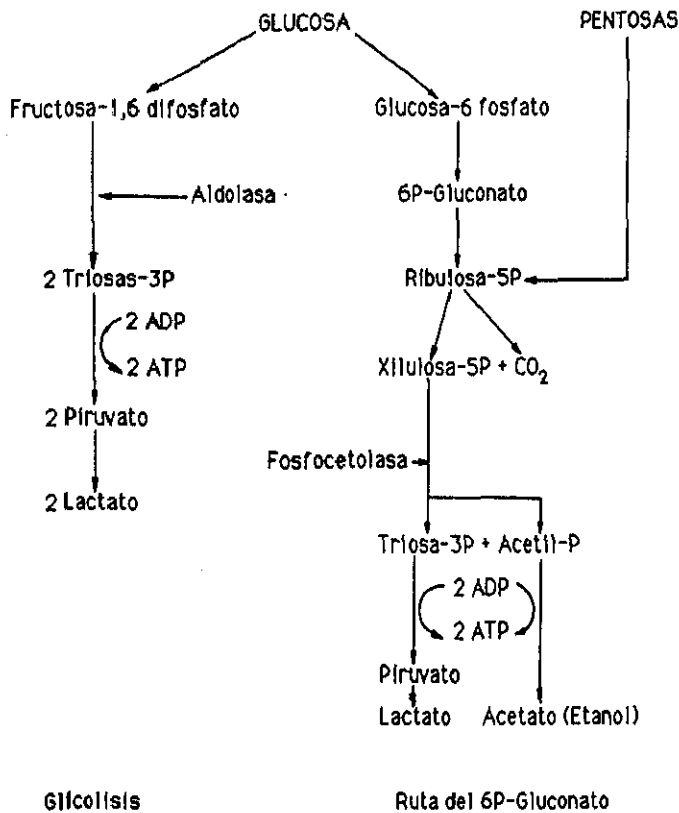


Figura 2. 1. - Principales rutas metabólicas de utilización de carbohidratos en las especies del género *Lactobacillus*
Fuente: Kandler, 1983.

carbohidratos utilizados, una característica importante para su identificación. No obstante, se sabe que la mayoría disponen de sistemas de transporte activo de aminoácidos y péptidos (Law y Kolstad, 1983).

II. 2. 6. - Plásmidos.

En la actualidad no se conocen muchas cepas del género *Lactobacillus* transformables o transducibles; sin embargo, se observan con frecuencia plásmidos, ligados a menudo a la resistencia a los antibióticos (Vescovo y col., 1982), al metabolismo de la lactosa (Chassy, 1976) o a la síntesis de bacteriocinas (Muriana y Klaenhammer, 1987; Klaenhammer, 1988).

II. 2. 7. - Estructura antigénica.

Son muchos los lactobacilos que basándose en la existencia de determinantes antigénicos específicos pueden asignarse a 7 grupos antigénicos diferentes (A,B,C,D,E,F,G) (Sharpe, 1981). La Tabla II. 3 recoge algunos de los grupos antigénicos detectables en microorganismos del género *Lactobacillus*, así como las características de los antígenos responsables y de su localización celular.

II. 2. 8. Ecología.

Los lactobacilos crecen bajo condiciones microaerófilas o anaeróbicas en todos los habitats que les proporcionen carbohidratos, productos del catabolismo proteico, nucleótidos y vitaminas. Las temperaturas mesófilas o ligeramente termófilas les son favorables; sin embargo, existen cepas de algunas especies que pueden crecer, aunque lentamente, a temperaturas cercanas al punto de congelación (Kitchell y Shaw, 1975).

Los lactobacilos son generalmente acidúricos o acidófilos, disminuyendo el pH de los sustratos en los que crecen hasta por debajo de 4.0, debido a la formación de ácido láctico, previniendo así, o al menos retrasando considerablemente, el desarrollo de otros microorganismos competidores a excepción de otras bacterias lácticas y levaduras. Estas propiedades convierten a los lactobacilos en valiosos habitantes del tracto intestinal del hombre y de los animales, así como en elementos importantes en la preservación de la calidad microbiológica de los alimentos.

11. 2. 9. - Taxonomía

En la actualidad, se sigue empleando la subdivisión tradicional de los lactobacilos en tres grupos (*Thermobacterium*, *Streptobacterium* y *Betabacterium*) propugnada por Orla-Jensen en 1919. Sin embargo, los lactobacilos de estas subdivisiones no pueden considerarse como subgéneros formales ya que no representan grupos filogenéticamente definidos. La clasificación más reciente del género, la de la última edición del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler y Weiss, 1986), los divide también en tres grupos, y aunque la mayoría de las especies de cada grupo coinciden con las definiciones originales de las termobacterias, estreptobacterias y betabacterias, los criterios para su clasificación no se basan, ni en la temperatura de crecimiento, ni en su morfología, características clásicas de los subgéneros de Orla-Jensen, sino, entre otras propiedades, en el tipo de peptidoglicano que poseen, en la movilidad electroforética de sus enzimas, en su grupo antigénico y en el isómero de ácido láctico producido (Bottazzi, 1988).

Los grupos propuestos por Kandler y Weiss (1986), son los siguientes:

Tabla II. 3. - Grupos antigénicos detectables en algunos microorganismos del género *Lactobacillus*

Especie	Grupo	Antígeno	Localización	Determinante
<i>L. helveticus</i>	A	GTA	Pared celular	α -D-glucosil
<i>L. casei</i>	B	Polisacárido	Pared celular	α -L-rhamnosil
<i>L. casei</i>	C	Polisacárido	Pared celular	α -D-glucosil
<i>L. plantarum</i>	D	RTA	Pared celular	α -D-glucosil
<i>L. delbrueckii</i>	E	GTA	Pared celular	Desconocido
<i>L. brevis</i>	E	GTA	Pared celular	Desconocido
<i>L. buchneri</i>	E	GTA	Pared celular	Desconocido
<i>L. fermentum</i>	F	GTA	Membrana	α -D-galactosil
<i>L. salivarius</i>	G	Polisacárido	Pared celular	L-rhamnosil

Símbolos: GTA: ácido glicerol telcoico; RTA: ácido ribitol telcoico.

Fuente: Sharpe, 1981.

a) Grupo I: lactobacilos homofermentativos obligados, en donde se incluyen los representantes del subgénero *Thermobacterium* de Orla-Jensen, y en los que de acuerdo con su homología DNA-DNA se distinguen dos grupos de especies o subespecies: el primero agrupa las tres subespecies de *L. delbrueckii* y el segundo está representado por *L. acidophilus*

b) Grupo II: lactobacilos heterofermentativos facultativos, donde se incluyen las estreptobacterias de Orla-Jensen. Se reconocen en él tres especies o subespecies: 1. *L. plantarum*, 2. subespecies de *L. casei*, y 3. *L. sake*, *L. curvatus* y *L. bavaricus*

c) Grupo III: lactobacilos heterofermentativos obligados, que contiene las clásicas betabacterias. Es el grupo cuya estructura filogenética necesita mayor clarificación.

II. 3. - GRUPO STREPTOBACTERIUM

El grupo de estreptobacterias está formado, en la definición original de Orla-Jensen (1919), por los lactobacilos homofermentativos mesófilos, característica que los separa de los lactobacilos "termófilos" (*Thermobacterium*) y de los heterofermentativos productores de gas (*Betabacterium*).

II. 3. 1. Estreptobacterias atípicas

Cuando se aíslan de la carne y productos cárnicos bacterias lácticas y particularmente lactobacilos, frecuentemente no pueden clasificarse siguiendo los esquemas empleados clásicamente ya que se basan en datos procedentes de microorganismos aislados de otras fuentes (Rogosa, 1970;

Sharpe, 1979). Para Ingram (1975), la ignorancia de las propiedades de los lactobacilos aislados de fuentes distintas de la leche y de los derivados lácteos es la que ha conducido a denominarlos "atípicos" o "no identificados".

El término "estreptobacterias atípicas" fue utilizado por primera vez por Thornley y Sharpe (1959), para denominar los microorganismos relacionados con *L. plantarum*, pero que poseían algunas diferencias significativas respecto de las estreptobacterias en general. Desde entonces, han sido muchos los investigadores que han aislado lactobacilos y los han clasificado como estreptobacterias "atípicas" (Kitchell y Shaw, 1975; Hitchener y col., 1892; Shaw y Hardy, 1984; Morishita y Shiromizu, 1986; Schillinger y Lücke, 1987; Korkeala y Mäkelä, 1989). Actualmente se considera a estos lactobacilos como la microflora más representativa de muchas carnes y productos cárnicos (Reuter, 1975; Holzapfel y Gerber, 1986; Schillinger y Lücke, 1987; Montel y col., 1989).

Los rasgos más característicos de este grupo son su tendencia a mostrar formas cocoides, su menor tolerancia a la acidez y sus menores temperaturas de crecimiento, por lo que se consideran lactobacilos psicrotrofos; de todas las bacterias lácticas son las que poseen temperaturas de desarrollo más bajas (Reuter, 1975; Reuter, 1981). La tabla II. 4 muestra las diferencias fisiológicas más significativas entre las estreptobacterias típicas y las atípicas.

II. 3. 1. 1. - *Lactobacillus sake*

Este microorganismo debe su nombre a haberse aislado originalmente de un cultivo iniciador para la elaboración de vino de arroz, "sake" en japonés (Katagiri y col., 1934). Su morfología típica es la de un bacilo

Tabla II. 4. - Diferencias morfológicas y fisiológicas más significativas entre las estreptobacterias típicas y las atípicas.

Características	Estreptobacterias	Estreptobacterias atípicas
<u>Crecimiento en medio sólido:</u>		
Díámetro de las colonias	1-2 mm	0.5-1 mm
Forma celular	bacilos	bacilos cortos
<u>Crecimiento en medio líquido:</u>		
Intervalo de temperatura		
mín.	4-8 °C	2-4 °C
máx.	42-45 °C	40-42 °C
pH final (30 °C, 5 días)	3.7-3.8	3.9-4.1
Crecimiento a pH 3.9	+	-
Fermentación del manitol	+	-

Fuente: Reuter, 1975, modificado.

corto, ligeramente curvado e irregular, de extremos redondeados, con unas dimensiones de 0.6-0.8 x 2-3 μm que se presenta aislado o en pequeñas cadenas. La mayoría de los aislados no crecen a 45 °C pero sí a 2-4 °C y poseen el enzima lactato racemasa. Otras características fisiológicas y bioquímicas de este microorganismo se muestran en la Tabla II. 5.

L. sake no está relacionado genéticamente con otros lactobacilos, a excepción de *L. curvatus* y *L. bavaricus* (Kagermeier y col., 1985). Mientras que la mayoría de los aislamientos de *L. bavaricus* exhiben una homología DNA-DNA absoluta con *L. sake*, entre *L. curvatus* y *L. sake* su homología es solamente del 40-50 %.

L. sake se aísla regularmente de vegetales fermentados, carne y productos cárnicos y pastas precocinadas. Posiblemente la mayoría de las estreptobacterias atípicas aisladas en el pasado de ensilados y productos cárnicos fermentados y envasados a vacío pertenecían a esta especie y a la de *L. curvatus* (Kandler y Weiss, 1986).

II. 3. 1. 2. - Lactobacillus curvatus

El nombre de este lactobacilo indica su forma curvada con extremos redondeados. Sus dimensiones son de 0.7-0.9 x 1-2 μm y se desarrolla en parejas o en cadenas cortas, mostrando frecuentemente anillos de cuatro células o formas en herradura. Otras características de esta especie se muestran en la Tabla II. 5.

II. 3. 1. 3. - Lactobacillus bavaricus

Son bacilos ligeramente curvados de bordes redondeados y sus

Tabla II. 5 - Características fisiológicas y bioquímicas de *L. salta*, *L. curvatus* y *L. bovaricus*

Características	<i>L. salta</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. bovaricus</i>
Tipo de peptidoglicano	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp	Lys-D-Asp
Ácido teicoico	No posee	No posee	No posee
Potencial electrolítico			
D-LDH	1,20	1,20	No posee
L-LDH	1,60	1,60	1,60
L-LDH plasmática	+	+	+
% Prot B + C	42-44	42-44	41-43
Lactato reducido	+	+	"
Isómeros del ác. láctico	DL	DL	L
Crecimiento a 2-4 °C	+	+	+
Crecimiento a 15 °C	+	+	+
Crecimiento a 45 °C	-	-	-
Formación de exopolisacáridos			
Amigdalina	+	"	"
Araquina	+	"	"
Celulosa	+	+	+
Caseína	+	+	+
Fructosa	+	+	+
Glutamina	+	+	+
Glucosa	+	+	+
Gluconato	+	+	+
Lactosa	+	+	+
Maltosa	+	+	+
Mantol	-	-	-
Mannosa	+	+	+
Melitiosa	-	"	"
Melitilosa	+	"	+
Rafinosa	-	"	-

Tabla II. 5. - (continuación)

Características	<i>L. sake</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. bavaricus</i>
<u>Fermentación de carbohidratos:</u>			
Ramnose	-	-	-
Ribosa	+	+	+
Salicina	±	+	+
Sorbitol	-	-	-
Sacarosa	+	-	+
Trehalosa	+	-	-
Xilosa	-	-	-

Fuente: Kandler y Weiss, 1986.

dimensiones son de 0.8-1.0 x 2-7 μ m, presentándose aislados o en cadenas cortas, a diferencia de los dos especies anteriores no poseen lactato racemasa. Actualmente se piensa que los aislamientos de *L. bavaricus*, de acuerdo con los estudios de homología DNA-DNA, serían subespecies de *L. sake* o de *L. curvatus* que no sintetizan lactato racemasa (Kandler y Weiss, 1986).

11.4 - LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LA CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS.

La carne fresca se altera rápidamente debido al crecimiento de bacterias Gram-negativas, por lo que se han desarrollado muchos métodos para preservarla, incluidos el curado y la fermentación. Las bacterias lácticas pertenecen a la microflora normal de las carnes y de muchos productos cárnicos, siendo los lactobacilos su componente predominante y estando frecuentemente acompañados de microorganismos estrechamente relacionados como pediococos, leuconostoc, enterococos y *Brochothrix thermosphacta*.

Las bacterias lácticas se desarrollan en condiciones que impiden el crecimiento de microorganismos aerobios Gram-negativos como pseudomonas. No necesitan oxígeno para crecer, son tolerantes a la presencia de CO₂, nitratos, humo y concentraciones de sal relativamente altas y, además, toleran valores de pH bajos. Por todo ello, las condiciones existentes en las carnes curadas, en las envasadas a vacío y en los productos cárnicos madurados, favorecen el crecimiento de estos microorganismos.

Los lactobacilos juegan un papel importante en los embutidos curados o madurados. Las especies más frecuentemente aisladas son *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. farcininus*, *L. alimentarius* y los lactobacilos "atípicos" (Reuter,

1975). Estos últimos se han identificado recientemente como *L. sake* y *L. curvatus* (Schillinger y Lücke, 1987; Rodríguez y col., 1989).

Durante el almacenamiento en refrigeración de los productos cárnicos son varias las especies de lactobacilos que se desarrollan (Reuter, 1981). En muchos casos, especialmente las otrora denominadas estreptobacterias atípicas, se convierten en el principal componente de la microflora bacteriana, al inhibir el desarrollo de otras especies microbianas, mejorando así la calidad microbiológica de estos alimentos. Sin embargo, otras especies, especialmente *L. viridescens* pueden conducir a la alteración de las carnes debido a la producción de olores anómalos, sabor ácido, viscosidad o enverdecimiento (Egan, 1983).

II. 5. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN LOS ALIMENTOS.

II. 5. 1.- Extensión de la vida útil.

Un aspecto interesante de las bacterias lácticas es su capacidad de prolongar la vida útil de determinados alimentos al inhibir el desarrollo de los microorganismos causantes de alteraciones. Mather y Babel (1959) demostraron que la alteración del queso tipo Cottage por *Ps. fragi* y *Ps. putrefaciens*, se retrasaba considerablemente si durante su elaboración se le adicionaba un cultivo de *S. citrovorus*. Elliker y col. (1964) observaron, también en el queso tipo Cottage, que el incremento de su vida útil derivaba de la inhibición de las bacterias alterantes por el desarrollo de las bacterias lácticas, y se encontraba directamente relacionado con la concentración de *L. lactis* subsp. *diacetylactis* en el producto final. Gilliland y Speck (1975)

confirmaron y extendieron estas observaciones, demostrando que en un medio a base de leche desnatada *L. bulgaricus* inhibía rápidamente el desarrollo de *Ps. fragi* y de otras bacterias Gram-negativas psicrotófas.

Otros investigadores han estudiado también la inhibición o retraso de la alteración de las carnes, especialmente las frescas, por acción de las bacterias lácticas. Reddy y col. (1970; 1975) han demostrado que se prolonga la vida útil de la carne picada de vacuno inoculada con *L. lactis* y *Leuconostocorum* y almacenada a 7 °C. Gilliland y Speck (1975) han descrito fenómenos de antagonismo frente a *Ps. fragi* incluso cuando el inóculo de bacterias lácticas (*L. bulgaricus* y *P. cerevisiae*) no se desarrollaba activamente. Roth y Clark (1975) observaron que las bacterias lácticas inhibían el crecimiento de *Br. thermosphacta* en las carnes envasadas a vacío. Razzan y col. (1979) demostraron que los cultivos iniciadores comerciales de *B. cerevisiae* y *L. plantarum* incrementaban la vida útil de la carne de pollo. No obstante, Smith y col. (1980) han señalado que la inoculación con bacterias lácticas no mejoraba la vida de almacén de la carne de vacuno.

Las bacterias lácticas prolongan la vida útil de las carnes y productos cárnicos debido, principalmente, a la acidificación que originan. La acidez del medio inhibe el desarrollo de los microorganismos indeseables y permite una deshidratación eficiente del alimento, con lo que su vida útil no se ve limitada por el deterioro bacteriano, sino por otras alteraciones de naturaleza química o física (Bacus y Brown, 1981). Actualmente se admite que las bacterias lácticas tienen gran interés como agentes que prolongan la vida útil de los alimentos (Gibbs, 1987).

II. 5. 2. - Control de microorganismos patógenos.

II. 5. 2. 1. - Bacterias.

Gilliland y Speck (1972), Park y Marth (1972) y Rubin y Vaughan (1979), utilizando cultivos mixtos de bacterias lácticas y salmonelas, observaron, en la leche desnatada, que el efecto inhibidor de las bacterias lácticas sobre las salmonela dependía de la bacteria láctica empleada. Cuando en la elaboración del queso Camembert se utilizaban cultivos iniciadores lácticos comerciales (Park y col., 1973; Frank y col., 1977; Frank y col., 1978) se inhibía significativamente el desarrollo de *Escherichia coli* enteropatógeno. Asimismo, Ahmed y col. (1986) han observado que el escaso desarrollo de *K. enterocolitica* en el yogur se debe a su pH ácido y a otros fenómenos competitivos generados por el cultivo iniciador. Westhoff y Engler (1972) detectaron, en los requesones, una rápida inactivación, tanto de *S. typhimurium* como de *S. aureus*, y sugirieron que se debía al bajo pH (4.5-4.6) que las bacterias lácticas habían desarrollado en el sustrato.

Debido al peligro que representan la carne y los diversos productos cárnicos como fuentes de toxoinfecciones alimentarias, se han sometido a un gran número de investigaciones para determinar el efecto de numerosos parámetros en el desarrollo de microorganismos patógenos para el hombre. Goepfert y Chung (1970) vieron que el número de salmonelas disminuía durante la maduración en los embutidos correctamente formulados, y adicionados de cultivos iniciadores de *Pedococcus* o *Lactobacillus* Riemann y col. (1972), analizando los resultados de diversos investigadores, concluyeron que el desarrollo de *S. aureus* en los alimentos y su síntesis de enterotoxinas dependía de la interacción entre pH y concentración de sal. Daly y col. (1973) observaron que los cultivos iniciadores comerciales no inhibían

530089940X

completamente el desarrollo de *S. aureus* pero si lo reducian considerablemente, de tal manera que se eliminaba la síntesis de enterotoxinas. Resultados similares han obtenido Baran y Stevenson (1975) y Nisakanan y Murmi (1976) (Tabla II 6.)

Las bacterias lácticas en presencia de concentraciones adecuadas de sacarosa o glucosa inhiben el desarrollo y la producción de toxinas de *Clostridium botulinum* (Christiansen y col., 1975; Tanaka y col., 1980) (Tabla II 7.) Este efecto se manifiesta incluso en ausencia de nitratos, por lo que algunos investigadores han postulado que las concentraciones de nitritos empleadas en ciertos productos cárnicos podrían disminuirse significativamente sin que su seguridad disminuyese, siempre que se añadieran determinadas bacterias lácticas y carbohidratos (Tanaka y col., 1980). Las bacterias lácticas también han demostrado su eficacia en el control del desarrollo de *V. enterocolitica* en las carnes y diversos productos cárnicos (Racch y Henningsen, 1984).

En los últimos años la denuncia de varios brotes de listeriosis humana asociados al consumo de alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* ha hecho que se multipliquen las investigaciones sobre el control de este microorganismo en los alimentos. A este respecto, se ha observado que muchas bacterias lácticas, algunas de las cuales son ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores, manifiestan una importante actividad inhibidora en el desarrollo de este microorganismo. En la mayoría de los casos está acción se debe en parte a las bacteriocinas elaboradas por las bacterias lácticas inhibidoras (Bhunia y col., 1988; Hoover y col., 1988; Pucci y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lucke, 1989; Rodríguez y col., 1989; Carminati, 1989).

Tabla II. 6. - Producción de enterotoxinas estafilocócicas en un embutido crudo madurado.

Formulación	Después de 3 días			Después de 7 días		
	Log ECP ^a	pH	Enterotoxina	Log ECP ^a	pH	Enterotoxina
Sin cultivo iniciador	8.84	5.9	+	8.88	5.7	+
Con cultivo iniciador	6.78	5.6	-	7.53	5.3	-

ECP: estafilococos coagulasa-positivos.

Fuente: adaptado de Niskanen y Nurmi, 1976.

Tabla II. 7. Producción de toxinas botulínicas en un embutido crudo madurado.

Nitrito (ppm)	Formulación		Nº de muestras tóxicas de 25 totales.
	Cultivo iniciador	Dextrosa	
0	-	+	8
0	+	-	22
0	+	+	2
50	+	+	0
150	-	-	14
150	+	+	0

Fuente: Christiansen y col., 1975.

11.5.2.2 - Virus

Tanto la leche cruda, como la pasteurizada deficientemente, han transmitido virus a los consumidores (Cliver, 1976). Cliver (1973) comprobó que los virus de la poliomielitis y de la influenza humana y de la estomatitis vesicular bovina presentes en la leche de vaca, no se destruyen durante la maduración del queso Cheddar, ni siquiera con el empleo de cultivos iniciadores.

De otra parte, los avatares de los virus presentes potencialmente en las carnes empleadas en la obtención de productos cárnicos curados han recibido muy poca atención. Hermann y Cliver (1973) vieron que la concentración de coxsackievirus disminuía considerablemente durante la maduración de los embutidos de tipo Thüringer en los que una cepa de *Lactobacillus* redujo el pH de 6.2 a 4.8. Kantor y Potter (1975) observaron que los virus de la polio perdían su infectividad durante la maduración del salami con cultivos iniciadores de *L. plantarum* y *P. cerevisiae*. En embutidos crudos curados con un cultivo iniciador de *Pediococcus* sp., McKercher y col. (1978) observaron que el virus de la peste porcina africana perdía su infectividad al final del periodo de maduración.

Los datos presentados por estos investigadores indican que durante la elaboración de los productos cárnicos curados se destruye la infectividad de varios virus; sin embargo, las escasas investigaciones realizadas hasta el momento no permiten generalizaciones.

II. 5. 2. 3. Hongos y micotoxinas.

Al inocular esporas de *Aspergillus flavus* en un cultivo de *L. lactis*, Coalier-Ascah y Idziak (1985) descubrieron que la acumulación de aflatoxinas B₁ y G₁ era mínima o no se detectaba. Los niveles de aflatoxinas también se reducían significativamente cuando *L. lactis* se inoculaba en un cultivo de *A. flavus*; El-Gendy y Marth (1980) y Wiseman y Marth (1981) habían obtenido previamente resultados similares. Sin embargo, Coalier-Ascah e Idziak (1985) observaron que la cepa de *L. lactis* utilizada poseía también la capacidad de degradar las aflatoxinas ya preformadas. Estos autores, utilizando el ensayo de Ames, demostraron que los sobrenadantes de los cultivos mixtos de *L. lactis* y *A. flavus* carecían de actividad mutagénica residual y, por lo tanto, de actividad carcinogénica potencial.

Karunaratne y col. (1990) han observado recientemente que en los medios de cultivo líquidos tres especies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. acidophilus* y *L. bulgaricus*) lo mismo inhiben el desarrollo de *A. flavus* subsp. *parasiticus* que disminuyen la cantidad de aflatoxinas B₁ y G₁ producidas. Este efecto se ha relacionado con la disminución del pH y con fenómenos todavía no bien conocidos de competición microbiana.

II. 5. 3. - Trichinella spiralis

En los embutidos crudos curados Bacus y Brown (1981) han sugerido que los cultivos iniciadores contribuyen indirectamente a la destrucción de las larvas de *T. spiralis* debido a una fermentación inicial controlada, rápida y consistente. Este parásito se afecta por el descenso del pH (Castro y col.,

1973), por lo que es posible que las bacterias lácticas, en presencia de carbohidratos fermentables, contribuyan considerablemente a la inactivación de este parásito.

Childers y col. (1982) han estudiado la inactivación de *T. spiralis* en salami elaborado con un cultivo iniciador de *P. cerevisiae* concluyendo que la concentración de NaCl era el factor más importante en la inactivación del parásito; lamentablemente, estos autores no estudiaron el efecto de la bacteria láctica en el proceso.

II. 5. 4. - Nitrosaminas.

Los nitratos y nitritos se adicionan a los productos cárnicos para inhibir el desarrollo de *C. botulinum* y estabilizar el color de las carnes curadas. Sin embargo, el nitrito residual reacciona con las aminas secundarias formando nitrosaminas, sustancias altamente carcinogénicas (Sen y col., 1974).

Varias bacterias lácticas, entre ellas las de *L. plantarum* empleadas como cultivos iniciadores, reducen los nitratos a nitritos, tanto en medios de cultivo líquidos como en la carne (Smith y Palumbo, 1978). La capacidad de estos microorganismos de reducir los nitratos a nitritos podría favorecer la formación de nitrosaminas. Este hecho podría esperarse sobretodo en embutidos formulados con niveles de nitratos elevados. Sin embargo, un estudio relativamente reciente que incluía un gran número de productos cárnicos fermentados curados indicó que no existían niveles detectables de nitrosaminas volátiles (Anónimo, 1980). Otros estudios realizados con productos cárnicos formulados con nitratos o nitritos y con la presencia de bacterias lácticas, de forma natural o por adición de un cultivo iniciador, han

demostrado que en dichos alimentos son bajos los niveles de nitrosaminas (Palumbo y col., 1974; Dethmers y col., 1975; Kotter y col., 1976).

El nivel de N-nitrosopirrolidina alcanzado en el bacon está directamente relacionado con la concentración de nitritos (Gray y Randall, 1979). Sin embargo, la concentración residual de nitritos en el bacon puede disminuirse empleando cultivos iniciadores lácticos (Bacus, 1979) (Tabla II. 8.). Durante la elaboración del bacon, las bacterias lácticas crecen y utilizan los carbohidratos existentes, reduciendo el pH de la carne; de otra parte, el bacon acidulado por la presencia de *L. plantarum* y un 0.5 % de sacarosa o glucosa impediría el desarrollo de *C. botulinum* en el caso de que se produjera un abuso en la temperatura de almacenamiento incluso cuando su contenido en nitrito sea pequeño o inexistente (Tanaka y col., 1980). En Estados Unidos el USDA (Dpto. de Agricultura de los EEUU) ha concedido una autorización para el empleo de cultivos iniciadores de bacterias lácticas en el bacon, con el objetivo de disminuir la formación de nitrosaminas (Houston, 1979). Tras un año de producción comercial de bacon, Brown (1980) ha señalado la eficacia de dicha medida para minimizar la formación de nitrosaminas.

II. 5. 5. Aminas biógenas.

La producción de aminas biógenas en los alimentos deriva de la actividad metabólica de los microorganismos y, específicamente, de la acción de las descarboxilasas microbianas que transforman los aminoácidos en aminas potencialmente tóxicas (Smith y Palumbo, 1983). Las aminas biógenas o vasoactivas pueden originar graves crisis hipertensivas en pacientes tratados con inhibidores de la monoamino-oxidasa (MAO). Los síntomas incluyen un aumento de la presión sanguínea, cefalea, fiebre, sudoración, vómitos y, en algunos casos, incluso la muerte (Blackwell y col., 1967).

Tabla II. 8. - Formación de nitrosaminas en el bacon⁴.

Formulación	Nitrito residual (ppm)	pH	Nitroso- pirrolidina (ppb)
Sin cultivo iniciador	20-40	6.0-6.4	10-30
Con cultivo iniciador	4-16	5.2-5.6	2-9

⁴ Intervalos medios de los valores observados.

Fuente: adaptado de Bacus, 1979.

Rice y Koehler (1976) demostraron que la actividad tirosina decarboxilasa e histidina decarboxilasa de *P. cerevisiae* y *L. plantarum*, constituyentes comunes de muchos cultivos iniciadores, era muy baja. La actividad descarboxilasa es mucho mayor cuando los embutidos crudos curados se someten a una fermentación natural que cuando ésta está gobernada por cultivos iniciadores lácticos (Taylor, 1978; Eitenmiller y col., 1978). El empleo en los productos cárnicos fermentados de *P. cerevisiae* y de ciertas especies del género *Lactobacillus* disminuye o inhibe el desarrollo de otros microorganismos dotados actividad tanto proteolítica como aminoácido descarboxilasa y presentes naturalmente en la mezcla cárnica. La inhibición de esta microflora indeseable impide la formación de niveles peligrosos de aminas biógenas (Eitenmiller y col., 1978).

II. 6. LAS BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS.

El origen del término "probiótico" se atribuye a Parker (1974) que lo utilizó para definir los organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. Fuller (1989) consideró esta definición como demasiado amplia e imprecisa ya que también podía comprender, por ejemplo, a los antibióticos; por ello redefinió a los probióticos como suplementos microbianos que afectan beneficiosamente al hospedador humano o animal, mejorando su equilibrio microbiano intestinal. Sin embargo, el concepto de manipulación de la microflora intestinal ya fue postulado por Metchnikoff (1907) el cual sugirió que el consumo de leche fermentada con lactobacilos podía prolongar la vida humana. Su teoría era que los lactobacilos desplazarían a los microorganismos productores de "toxinas" que se encuentran normalmente en el tracto intestinal. Los posibles mecanismos de acción de los probióticos se recogen en la Tabla II. 9. y las características de un buen probiótico en la Tabla II. 10.

Tabla II. 9. - Posibles mecanismos de acción de los probióticos.

1. Eliminación de microorganismos viables:
 - a. producción de compuestos antimicrobianos
 - b. competición por nutrientes
 - c. competición por lugares de adhesión
 2. Alteración del metabolismo microbiano:
 - a. actividad enzimática aumentada
 - b. actividad enzimática disminuida
 3. Estimulación de la inmunidad:
 - a. aumento de los niveles de anticuerpos
 - b. aumento de la actividad de los macrófagos
-

Fuente: Fuller, 1989.

Tabla II. 10. - Características de un buen probiótico.

1. Ejercer un efecto beneficioso en el hospedador humano o animal
 2. Ser apatógeno y atóxico
 3. Estar presente como células viables, preferiblemente en grandes números
 4. Capaz de sobrevivir y desarrollar su actividad metabólica en el ambiente intestinal
 5. Estable y capaz de permanecer viable durante largos periodos de tiempo
-

Fuente: Fuller, 1989.

11. 6. 1. - Control de patógenos intestinales.

Desde los primeros trabajos de Metchnikof (1907) se han realizado muchos estudios sobre el papel de los lactobacilos, especialmente *L. acidophilus*, en el control de los microorganismos patógenos intestinales.

Mitchell y Kenworthy (1976) han observado que lechones alimentados con piensos con *L. bulgaricus* e infectados artificialmente con cepas patógenas de *E. coli*, crecieron más deprisa y sufrieron menos diarreas que los animales control no suplementados con lactobacilos. En lechones suplementados durante 8 semanas con *L. lactis* los recuentos de coliformes de las heces disminuían progresivamente (Muralidhara y col., 1977); Fuller (1977) obtuvo resultados similares en pollos gnotobióticos inoculados con *E. coli* y *L. acidophilus*. Los extractos libres de células de *L. casei* y *L. acidophilus* también han demostrado su eficacia para inhibir el desarrollo de *E. coli* (Hosono y Tokita, 1977). Otros estudios han descrito la disminución de diarreas en terneros alimentados con células viables de *L. acidophilus* y la disminución de coliformes en sus heces (Bruce y col., 1979). Estos hallazgos contrastan con los de otros investigadores que no han observado efectos beneficiosos derivados de la presencia en los alimentos consumidos por los animales de *L. acidophilus* (Hatch y col., 1973; Ellinger y col., 1978) o de *L. lactis* (Morrill y col., 1977).

Watkins y Miller (1983) estudiaron en pollos gnotobióticos los efectos profilácticos y terapéuticos de *L. acidophilus* frente a *S. typhimurium* y *S. aureus*. Los tratamientos profilácticos fueron, en todos los casos, mucho más efectivos que los terapéuticos, originando en los pollos en unas tasas de mortalidad menores. Resultados similares se obtuvieron previamente utilizando cepas de *E. coli* enteropatógeno (Watkins y col., 1982).

En la especie humana son difíciles de realizar los estudios para evaluar la actividad antagonista de los lactobacilos, especialmente los que implican a microorganismos patógenos (Gilliland, 1989). No obstante, Gordon y col. (1957) en un estudio sobre la acción de *L. acidophilus* en 66 pacientes que recibían antibiótoterapia oral, observaron que dicho microorganismo inhibía el desarrollo de los estafilococos del intestino. Gilliland y Speck (1977) demostraron que en cultivos mixtos *L. acidophilus* inhibía el desarrollo de *S. aureus*, *S. typhimurium* y *E. coli* enteropatógeno. El mismo estudio reveló que la actividad inhibidora variaba entre las diferentes cepas de *L. acidophilus* evaluadas. Recientemente, se han obtenido resultados prometedores en los estudios preliminares sobre el empleo de lactobacilos para combatir la colitis pseudomembranosa de las personas (infección por *Clostridium difficile* asociada a una antibiótoterapia oral) (Gorbach y col., 1987).

II. 6. 2. - Promoción del crecimiento de los animales.

Con el objeto de sustituir o eliminar el uso generalizado de antibióticos y sustancias químicas sintéticas se ha postulado el empleo de los probióticos como promotores del crecimiento de los animales. Sin embargo, no se dispone todavía de resultados experimentales bien controlados (Fuller, 1989).

Baird (1977) observó un aumento de la ganancia de peso diario y una mejora de la conversión del pienso en los cerdos que recibían con su ración un suplemento de lactobacilos. Con el mismo probiótico, Pollman y col. (1980) obtuvieron resultados positivos en cerdos jóvenes pero no en cerdos en su fase final de crecimiento; estos investigadores sugirieron que ello podría deberse al consumo de raciones diferentes. Cuando Pollman (1986) analizó los resultados obtenidos durante un largo periodo de tiempo con cerdos jóvenes

encontró que la media de los obtenidos mostraba un efecto positivo. La mejoría en el porcentaje de ganancia ponderal fue del 8.4 % en los cerdos que consumían raciones suplementadas con lactobacilos.

En estudios realizados en los estados americanos de Arizona y Florida, Miles y col. (1981) comprobaron estadísticamente que la suplementación con cultivos vivos de *L. acidophilus* de la ración de dos variedades comerciales de gallinas ponedoras originaba un aumento significativo de la puesta de huevos, sin que se alterasen ni la calidad, ni el peso de los mismos.

II. 6. 3. - Prevención de la intolerancia a la lactosa.

La incapacidad de digerir la lactosa se debe a una deficiencia en la síntesis del enzima β -galactosidasa de las células del Intestino delgado. La capacidad de los microorganismos del tracto intestinal para digerir la lactosa fue descrita por Siddons y Coates (1972), al determinar la influencia de la lactosa de la dieta en la actividad lactasa del intestino de pollos gnotobióticos.

Actualmente se sabe que las personas intolerantes a la lactosa digieren mejor la lactosa del yogur que la de la leche (Gallagher y col., 1974). Gilliland y Kim (1984) han evaluado en personas intolerantes la influencia del yogur en la utilización de la lactosa y los resultados obtenidos han confirmado los de Gallagher y col (1974). El yogur ejerce este efecto beneficioso porque el cultivo iniciador compuesto de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* sintetiza el enzima β -galactosidasa. Garvie y col. (1984) demostraron que las ratas alimentadas con yogur poseían en el Intestino delgado una mayor concentración β -galactosidasa de origen microbiano.

Las bacterias que componen los cultivos iniciadores del yogur no son bilis-resistentes, por lo que no sobreviven en el tracto intestinal; la presencia de bilis en el intestino incrementa la capacidad de las células bacterianas de hidrolizar la lactosa al aumentar su permeabilidad y favorecer la salida de la enzima β -galactosidasa (Gilliland, 1989). Kim y Gilliland (1983) han demostrado que la leche suplementada con *L. acidophilus* ejerce el mismo efecto que el yogur por lo que bajo esta forma la leche puede emplearse en las personas a quienes les desagrada el sabor ácido del yogur.

La actividad β -galactosidasa varía en las diferentes especies de *Lactobacillus* e, incluso, entre las cepas de una misma especie, por lo que cuando se pretendan emplear los lactobacilos con el propósito de liberar el enzima β -galactosidasa conviene seleccionar las cepas que muestran una actividad enzimática más elevada (Gilliland y Lara, 1988).

11. 6. 4 - Tratamiento de la constipación intestinal.

Algunos de los primeros experimentos clínicos realizados con lactobacilos estaban relacionados con su efecto en la constipación intestinal. Rettger y Cheplin (1921) influenciaron favorablemente la función intestinal de los pacientes con este problema, suplementando su dieta con *L. acidophilus*. Recientemente, Alm y col. (1983) y Graf (1983) han empleado leche con *L. acidophilus* en el tratamiento de la constipación intestinal; los resultados han sido francamente alentadores.

11. 6. 5. - Actividad anticarcinogénica

Desde que Bogdanov y col. (1962) observaron por primera vez que *L. bulgaricus* elaboraba sustancias activas frente al desarrollo de tumores, han sido muchos los trabajos realizados; actualmente se sabe que las propiedades anticarcinogénicas de los lactobacilos pueden agruparse en tres categorías:

1. Inhibición de la proliferación de células tumorales: observación basada en las experiencias de Reddy y col. (1973) y Shahani y col. (1983), quienes empleando ratas como animal modelo, comprobaron que *L. acidophilus* era antagonista de la proliferación de las células tumorales.

2. Inhibición del desarrollo de bacterias que sintetizan enzimas como β -glucosidasa, β -glucuronidasa y azoreductasa. Estos enzimas se sabe que transforman los compuestos procarcinógenos en carcinógenos en el tracto intestinal. Goldin y Gorbach (1977; 1984) han observado que la actividad de estos enzimas desaparece o se reduce considerablemente en personas que toman leche con *L. acidophilus*.

3. Inactivación de cancerígenos, tales como las nitrosaminas (Rowland y Grasso, 1975) y supresión de la actividad nitroreductasa, involucrada en la síntesis de nitrosaminas (Goldin y Gorbach, 1984).

11. 6. 6. - Control de la colesterolemia

En los individuos hipercolesterolémicos, la reducción de los niveles de colesterol sérico se relaciona con una disminución significativa de los riesgos de sufrir ataques cardíacos y otros procesos tromboembólicos. Actualmente se conoce que la microflora intestinal influye los niveles de

colecsterol sérico.

Mann y Spoerry (1974) observaron que los niveles de colecsterol sérico de los hombres de una tribu Masai disminuían después del consumo de grandes cantidades de leche fermentada con una cepa salvaje de *Lactobacillus*. Harrison y Peat (1975) estudiando el efecto en el colecsterol sérico de células de *L. acidophilus* añadidas a un alimento infantil, dedujeron que las bacterias actuaban reduciendo su absorción por el tracto intestinal. Grunewald (1982) confirmó que las leches fermentadas dan lugar a una concentración de colecsterol sérico menor que la leche fresca; ésta autora sugirió que la leche fermentada contiene metabolitos bacterianos que inhiben la síntesis de colecsterol en el organismo humano.

Algunos lactobacilos tienen un efecto directo en la concentración de colecsterol al que asimilan, eliminándolo del medio de cultivo. Otras experiencias han demostrado que dichos microorganismos reducen significativamente los niveles de colecsterol del suero de los cerdos cuya dieta había sido, incluso, suplementada con colecsterol (Gilliland y col., 1985), resultados que confirman los obtenidos por Tortuero y col. (1975) en experiencias similares con gallinas ponedoras. Además de *L. acidophilus* Nielsen y Gilliland (1985) han demostrado que *L. casei* y *L. plantarum* también poseen la capacidad de asimilar el colecsterol.

Otra actividad exhibida por *L. acidophilus* que puede influenciar la colesteroemia, es su capacidad de desconjugar los ácidos biliares (Gilliland y Speck, 1977), lo que reduce la absorción del colecsterol a nivel intestinal. Archer (1987) ha sugerido que las endotoxinas de muchas bacterias Gram negativas presentes en los alimentos y con capacidad invasora, pueden iniciar una compleja secuencia de respuestas celulares y de interacciones en la

pared de los vasos sanguíneos que dan como resultado la formación de una placa ateromatosa. En este sentido, el control que las bacterias lácticas ejercen en el desarrollo de estos microorganismos, tanto en el alimento como en el tracto intestinal, puede reducir el efecto citado.

11. 6. 7. - Estimulación de la inmunidad.

Los animales convencionales, con una flora intestinal completa y compleja, poseen una actividad fagocitaria y una concentración de inmunoglobulinas mayor que los animales libres de microorganismos (Bealmeir y col., 1984). El suministro de yogur a ratones gnotobióticos incrementa la concentración de inmunoglobulinas séricas (Wade y col., 1984). Los lactobacilos también están implicados en la estimulación de la actividad fagocitaria y, en este contexto, se ha demostrado que *L. casei* es muy activo cuando se suministra oralmente a los ratones (Perdigón y col., 1986).

Para que los lactobacilos realicen las actividades citadas, es necesario que migren del intestino a la circulación sistémica (Berg, 1983) donde persisten durante muchos días en el bazo, hígado y pulmones (Bloksma, 1981). Así, *L. casei* y *L. plantarum* administrados parenteralmente estimulan la actividad fagocitaria (Saito y col., 1981; Kato y col., 1983; Bloksma y col., 1981) mientras que *L. plantarum* también aumenta la actividad natural de las células "asesinas" ("killer") (Kato y col., 1981; Friend y Shahani, 1984; Reddy y col., 1983). Estos hallazgos que ponen de manifiesto un efecto sistémico en la inmunidad indican que los probióticos, no sólo modifican la flora intestinal, sino que inciden en la patogenia de enfermedades que tienen lugar en tejidos alejados del tracto intestinal (Fuller, 1989).

II. 7. - SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR LAS BACTERIAS LÁCTICAS

II. 7. 1. Ácidos orgánicos.

La supervivencia y el desarrollo de los microorganismos en los alimentos están gobernados por muchos parámetros, uno de los cuales es el pH. Una manera eficaz de limitar el desarrollo de muchos microorganismos es incrementando la acidez del alimento, con lo que se crea un ambiente desfavorable para los mismos. Ello puede conseguirse mediante la adición de un acidulante o facilitando el desarrollo de fermentaciones microbianas naturales o controladas. El efecto de los ácidos orgánicos en los microorganismos depende de la especie, tipo y concentración de ácido, del tiempo de exposición, de la capacidad neutralizante o tampón del alimento y de las condiciones preexistentes en los mismos, que los hace más o menos sensibles o resistentes a la acidez.

Las bacterias lácticas no sólo toleran los ácidos débiles lipofílicos, sino que, de hecho, son un producto de su metabolismo (sección II. 2. 5.). El ácido láctico es el producido en mayor cantidad por las bacterias lácticas; su efecto inhibitor en el desarrollo de otros microorganismos se ha evaluado en fermentaciones controladas con bacterias lácticas que aceleran la producción de tal ácido, retrasando o inhibiendo el crecimiento de los microorganismos patógenos y alterantes como, *S. aureus* (Nurmi, 1966; Genigeorgis y col., 1971; Barber y Delbel, 1972; Daly y col., 1973; Metaxopoulos y col., 1981), *Salmonella* sp. (Goepfert y Chung, 1970; Park y Marth, 1972; Masters, 1981), *C. botulinum* (Christiansen y col., 1975; Tanaka y col., 1980), *Br. thermosphacta* (Grau, 1980) y *V. enterocolitica* (Ahmed y col., 1986).

Otros ácidos orgánicos producidos por las bacterias lácticas y que también son antagonistas del desarrollo de diversos microorganismos alterantes o patógenos son el ácido cítrico (Subramanian y Marth, 1968), el acético (Daly y col., 1972; Díez, 1983) y algunos ácidos grasos volátiles (Goepfert y Hicks, 1969).

11. 7. 2. - Peróxido de hidrógeno.

Los lactobacilos producen peróxido de hidrógeno según los mecanismos mostrados en la Figura 2. 2.

La acumulación de peróxido de hidrógeno en los medios de cultivo se debe a que los lactobacilos, en general, no poseen catalasa (Kandler y Weiss, 1986). La actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno está bien documentada. El efecto antagónico del peróxido de hidrógeno se ha observado en muchos microorganismos, entre los que se encuentran *S. aureus* (Dahiya y Speck, 1968) y *Pseudomonas* sp. (Price y Lee, 1970).

El peróxido de hidrógeno puede reaccionar con otros componentes para formar sustancias inhibidoras. En la leche cruda el peróxido de hidrógeno generado por las bacterias lácticas reacciona con el tiocianato endógeno en una reacción catalizada por la lactoperoxidasa, lo que genera productos intermediarios de la oxidación que inhiben el desarrollo de muchos microorganismos. Este mecanismo de inhibición se conoce como "sistema antibacteriano lactoperoxidasa" (Relter y Hårnulv, 1984; Banks y col., 1986).

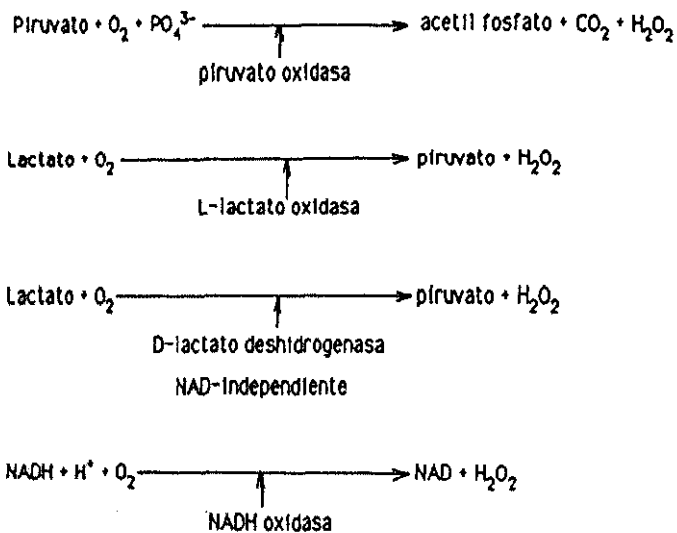


Figura 2. 2. - Producción de peróxido de hidrógeno por las bacterias lácticas.

Fuente: Kandler, 1983.

II. 7. 3. - Diacetilo

El diacetilo (2,3-butanodiona) es uno de los productos finales del metabolismo de las bacterias lácticas procedente del piruvato (Kandler, 1983). Muchas especies de los cuatro géneros de bacterias lácticas poseen la capacidad de sintetizar este compuesto. El diacetilo es bien conocido por el aroma que imparte a los productos lácteos y, sobretudo, a la mantequilla y porque es un antagonista del desarrollo microbiano. Jay (1982) demostró que el diacetilo inhibía a las levaduras y a las bacterias Gram-negativas a una concentración de 200 µg/ml, y a las bacterias Gram-positivas a una concentración de 300 µg/ml. Las bacterias lácticas no se inhiben a concentraciones menores de 350 µg/ml.

Aunque el diacetilo es una sustancia reconocida como segura (figura en las listas GRAS), su utilidad en la conservación de alimentos es limitada debido a las cantidades relativamente grandes que se necesitan para lograr dicho objetivo. Además, su intenso aroma impediría su empleo en muchos alimentos; Jay (1982) sugirió que el diacetilo podría utilizarse como antimicrobiano en utensilios y superficies de trabajo debido a su alta volatilidad.

II. 7. 4. - Reuterina

La reuterina es una sustancia de bajo peso molecular, no proteica y muy soluble, producida por un lactobacilo heterofermentativo, *Lactobacillus reuteri*. La reuterina es un agente antimicrobiano de amplio espectro, como se desprende de su actividad frente a ciertas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, hongos y protozoos (Talarico y col., 1988). Entre los organismos de importancia en salud pública inhibidos por la reuterina se

Incluyen especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Trypanosoma*.

II. 7. 5. - Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas producidas por un gran número de especies bacterianas. Las bacteriocinas se definen como proteínas o complejos proteicos con actividad bactericida en especies bacterianas, por lo general, estrechamente relacionadas con la especie productora (Tagg y col., 1976). Actualmente el término bacteriocinogenicidad se emplea para describir la actividad de las bacterias de sintetizar y liberar al medio proteínas inhibidoras del desarrollo de otras bacterias; las bacteriocinas constituyen un grupo heterogéneo de sustancias ya que presentan gran variedad respecto de las bacterias que las producen, amplitud de espectro antimicrobiano, mecanismo de acción y propiedades químicas y bioquímicas (Klaenhammer, 1988; Daeschel, 1989; Daeschel y col., 1990).

En la actualidad se dispone de cierta información sobre la producción de bacteriocinas por las bacterias lácticas. Por lo que respecta a los lactobacilos, los microorganismos involucrados en la producción de bacteriocinas son *L. fermentum* (DeKlerk, 1967; DeKlerk y Smit, 1967), *L. helveticus* (Upreti y Hindshill, 1973; 1975; Joerger y Klaenhammer, 1986), *L. acidophilus* (Barefoot y Klaenhammer, 1983; 1984; Muriana y Klaenhammer, 1987), *L. plantarum* (Daeschel y col., 1986; West y Warner, 1988), *L. sake* (Schilling y Lücke, 1989a; Mortvedt y Nes, 1990), *L. brevis* (Rammelsberg y Radler, 1990) y *L. casei* (Rammelsberg y Radler, 1990).

En las bacterias Gram-positivas, los determinantes genéticos ligados a plásmidos gobiernan, normalmente, tanto la producción de bacteriocinas como

la inmunidad a las mismas. Sin embargo, la búsqueda de determinantes genéticos ligados a plásmidos que codifiquen la producción de bacteriocinas en lactobacilos ha sido, tradicionalmente, infructuosa. La identificación de dos plásmidos relacionados con la producción de bacteriocina y la inmunidad a la misma en transconjugantes de *L. acidophilus* 88 (Muriana y Klaenhammer, 1987) proporcionó la primera evidencia de la importancia de los plásmidos en los fenómenos de transferencia génica y en la producción de proteínas antimicrobianas por los lactobacilos. Recientemente, Schillinger y Lücke (1989a) y Mortvedt y Nes (1990) han observado que la síntesis de sakacina A y de lactacina S por cepas de *L. sake* de origen cárnico están codificadas en plásmidos.

Los pediococos también producen bacteriocinas. Entre las especies implicadas figuran *P. cerevisiae* (Fleming y col., 1975; Gonzalez y Kunka, 1987; Bhunia y col., 1987; Ray y col., 1988; Hoover y col., 1988; Nielsen y col., 1990) y *P. pentosaceus* (Daeschel y Klaenhammer, 1985; Graham y McKay, 1985). La capacidad de los leuconostocs de sintetizar bacteriocinas ha sido menos investigada. Orberg y Sandine (1984) observaron que tres cepas de *L. dextranicum* y dos de leuconostocs, no identificados, producían sustancias que inhibían el desarrollo de otras bacterias lácticas. Recientemente se ha demostrado la producción de bacteriocinas por cepas de *Carnobacterium divergens* y *Car. piscicola* (Ahn y Stiles, 1990a; 1990b).

Los conocidos hasta hace relativamente poco tiempo como estreptococos lácticos y actualmente denominados lactococos, también producen bacteriocinas, de las que las más conocidas son la nisina, diplococina y lactostrepcinas. El término "nisina" describe a una familia de antibióticos polipeptídicos (tipos A, B, C, D, E) producidos por *Lactococcus lactis* (Hurst, 1981). Se trata de la bacteriocina mejor caracterizada de todas las proteínas

antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas; en la actualidad, se permite su utilización, como conservador, en un gran número de alimentos (Hurst, 1981; 1983), habiéndose comprobado su eficacia en el control de *C. botulinum* (Denny y col., 1961; Scott y Taylor, 1981). La diplococina es un polipéptido antimicrobiano producido por varias cepas de *L. cremoris* cuya actividad, a diferencia de la nisina, se limita a otros lactococos; la diplococina purificada es muy inestable (Davey y Richardson, 1981). En 1978, Kozak y colaboradores dieron el nombre de lactostrepcinas a unas sustancias antimicrobianas, diferentes de la nisina, producidas por cepas de *L. lactis* y *L. lactis* subsp. *diacetylactis*. Estas sustancias se caracterizan por ser las únicas bacteriocinas conocidas que sólo actúan a pH ácido. Aparte de las citadas, existen otros ocho tipos de bacteriocinas producidas por lactococos y clasificadas según su espectro de actividad, su sensibilidad a los enzimas proteolíticos y al calor y sus reacciones cruzadas (de inmunidad y sensibilidad) con otras cepas productoras de bacteriocinas (Geis y col., 1983). Las bacteriocinas de los grupos II y III producidas por cepas de *L. cremoris* exhiben características similares a las de la diplococina. Las bacteriocinas de tipo VI y VII poseen actividad frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas.

Con el objeto de esquematizar, de la forma más sencilla posible, las características más significativas de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas, se han elaborado las Tablas II. 10. y II. 11. que recogen y muestran sus características más relevantes.

Como ya se ha indicado, las bacterias lácticas producen bacteriocinas que inhiben el desarrollo de otras bacterias Gram-positivas. Sin embargo, unas sólo inhiben a especies estrechamente relacionadas, mientras otras son activas frente a un número más numeroso de bacterias. No obstante, ambos

tipos de bacteriocinas proporcionan a los microorganismos productores ventajas adicionales, frente a otras bacterias, para desarrollarse en ecosistemas fermentativos (Klaenhammer, 1988). Además, la capacidad de muchas bacteriocinas de inhibir el desarrollo de algunos microorganismos patógenos, como *List. monocytogenes* (Hoover y col., 1988; Daeschel y col., 1988; Ray y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Carminati, 1989; Nielsen y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990) hace muy atractivo su posible empleo en conservación de alimentos.

Asimismo, la utilización de métodos genéticos en la construcción y mejora de las bacterias lácticas bacteriocinogénicas es muy prometedora en lo que se refiere al desarrollo de cultivos iniciadores únicos y de nuevos sistemas de conservación de alimentos. La manipulación genética en la producción de bacteriocinas y en la inmunidad a las mismas proporcionarán en un futuro cercano las bases para implementar la capacidad bacteriocinogénica de las bacterias lácticas, aumentando su actividad inhibidora y permitiendo producir diferentes bacteriocinas con capacidad de inhibir, cooperativamente, a un gran número de microorganismos alterantes y patógenos.

Tabla II. 10. - Características de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (1).

Cepa productora	Nombre	Composición	Pm (Da)	Termorresistencia ^a
<i>L. fermentum</i> 466	-	Lipoglicoproteína	ND	+
<i>L. helveticus</i> LP27	Lactocina 27	Glicoproteína	12400	+
<i>L. helveticus</i> 481	Helveticina J	Proteína	37000	-
<i>L. acidophilus</i> N2	Lactocina B	Proteína	6500	+
<i>L. acidophilus</i> 88	Lactocina F	Proteína	ND	+
<i>L. plantarum</i> C-11	Plantaricina A	Proteína	> 8000	+
<i>L. sakei</i> b 706	Sakacina A	Proteína	ND	+
<i>L. sakei</i> L45	Lactocina S	Proteína	>12000	+
<i>L. brevis</i> B37	Brevicina 37	Proteína	>50000	+
<i>L. casei</i> B80	Caseicina 80	Proteína	>50000	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisina	Polipéptido	3500	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Diplococina	Polipéptido	5300	-
<i>S. cremoris</i> , <i>L. lactis</i>	Lactostreptocinas	Proteínas	> 10000	+
<i>P. cerevisiae</i> BB-63	-	Proteína	ND	+
<i>P. pentosaceus</i>	Pediacina A	Proteína	ND	+
<i>P. acidilactici</i> PA1.0	Pediacina PA-1	Proteína	16500	+
<i>P. acidilactici</i> H	Pediacina AcH	Proteína	2700	+
<i>C. piscicolid</i> V17	-	Proteína	> 8000	+

^a: Resistencia a tratamientos de, al menos, 96 °C, 30 min. ND: No determinado.

Tabla II 11 - Características de las bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas (11).

Cepas productoras	Sensibilidad a enzimas proteolíticos	Espectro de inhibición	Peculiaridades
<i>L. fermentum</i> 46-6	T, P	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. fermentum</i>	
<i>L. helveticus</i> P27	T, Pr	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. helveticus</i>	Bacteriolíticas
<i>L. helveticus</i> 481	F, T, P, Pr, PK S	<i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. bulgaricus</i>	
<i>L. acidophilus</i> H2	PK	<i>L. helveticus</i> , <i>L. leichmannii</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i>	
<i>L. acidophilus</i> 9-8	F, PK, T, S	<i>L. helveticus</i> , <i>L. leichmannii</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>S. faecalis</i> , <i>L. lactis</i>	Ligada a un plásmido
<i>L. plantarum</i> C-11	DND	<i>L. plantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. paramestoroides</i>	
<i>L. sakei</i> 6706	T, P	Otras LAB, <i>L. monocytogenes</i>	Ligada a un plásmido
<i>L. sakei</i> 45	PXIV, T	Otras LAB	Ligada a un plásmido
<i>L. brevis</i> B37	Pr, T	Otras LAB, <i>Moraxella caroliniana</i>	
<i>L. casei</i> B80	Pr, T, PK, Q	<i>L. casei</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Q	Bacterias Gram + en general	Genética no aclarada
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	T, Pr, Q	Lactococos	Inestable a Tª ambiente
<i>L. lactis</i> (subsp. <i>lactis</i> v. <i>cremoris</i>)	T, Q, Pr, FA	Lactococos, <i>L. helveticus</i> , <i>L. cyroaerum</i>	Actives a pH ácido
<i>P. carnis</i> def BB-63	Pr	Bacterias Gram + en general	No purificado, Ligada a un plásmido

Tabla II. 11. - (continuación)

Cepa productora	Sensibilidad a enzimas proteolíticos	Espectro de inhibición	Peculiaridades
<i>P. pentosaceus</i>	Pr	Bacterias Gram + en general	Ligado a un plásmido
<i>P. acidilactici</i> PAC1.0	PA, Q	Otras LAB	Ligado a un plásmido
<i>P. acidilactici</i> H	PK, PIX, PIV, T, Q, F, PA	Bacterias Gram + en general	Ligado a un plásmido No inmunogénica
<i>C. piscicola</i> LY17	PIV, S, PX, T, Q, PA	Otras LAB, enterococos y <i>L. monocytogenes</i>	Ligado a un plásmido Posible producción de dos bacteriocinas

Símbolos: F: ficina; FA: fosfolipasa A; P: pepsina; PA: papaina; PK: proteasa K; Pr: pronasa; PIV: proteasa IV; PIX: proteasa IX; PX: proteasa X; PXIV: proteasa XIV; Q: α -quimotripsina; S: subtilisina; T: tripsina; DND: datos no disponibles; LAB: bacterias lácticas

CAPITULO III

MATERIALES

Y

METODOS

III.1 - MATERIALES

III.1.1 - Material biológico

III.1.1.1 - Microorganismos empleados

Las bacterias lácticas utilizadas en la realización de este trabajo se aislaron de embutidos crudos curados donados generosamente por la empresa cárnica Industrias Caba S.A., de Madrid. Las cepas se aislaron siguiendo un método aleatorio y la mayor parte de ellas se identificaron tentativamente como *Lactobacillus sake* siguiendo el esquema de identificación de Schillinger y Lücke (1987).

Los microorganismos utilizados como indicadores para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas procedentes de los embutidos crudos curados, así como el origen de los mismos se muestran en la Tabla III.1. Todos los microorganismos se mantuvieron en congelación a -20 °C, revitalizándolos cada dos meses mediante dos o tres pases en caldo nutritivo.

III.1.1.2 - Determinación del ácido láctico, enzimas y controles proteolíticos

La determinación de los ácidos L(+) y D(-) láctico se llevó a cabo con el "kit" enzimático comercializado por "Boehringer Mannheim" para tal fin.

Los enzimas proteolíticos empleados en la caracterización de la sustancia antimicrobiana producida por *L. sake* 449 fueron suministrados por

"Merck" y "Sigma"⁽¹⁾.

Las proteínas estándar, de peso molecular conocido empleadas en las técnicas electroforéticas, fueron suministradas por "Pharmacia".

III. 1. 1. 3. - Productos y reactivos.

Los productos químicos utilizados en las experiencias descritas en este trabajo fueron de calidad reactivo y suministrados por las siguientes firmas. "Merck", "Probuc", "Sigma", "Fluka" o "Panreac".

Los productos utilizados en las experiencias microbiológicas procedían de las firmas "Difco" y "Oxoid", excepto los componentes minerales, azúcares y colorantes que fueron suministrados por "Merck", "Panreac" y "BDH".

En las técnicas para la identificación de plásmidos se emplearon productos suministrados por "Sigma", "BDH" y "FSA". Para la realización de las técnicas cromatográficas y electroforéticas se utilizaron productos suministrados por "Pharmacia" y "Bio-Rad".

III. 1. 2. - Material de laboratorio.

En la preparación de los medios de cultivo y soluciones acuosas se ha empleado agua destilada, obtenida de un destilador "Afera"⁽¹⁾ y desmineralizada en un intercambiador "Seta" mod. R600.

⁽¹⁾ La cita de marcas comerciales no significa que el autor las recomienda con preferencia a otras del mercado.

Tabla III.1 - Microorganismos indicadores empleados para evaluar la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas aisladas en embutidos crudos curados.

Microorganismo indicador	Cepa n°	Origen ^a
Bacterias ácido-lácticas		
<i>L. acidophilus</i>	209	CECT
<i>L. brevis</i>	Lb226	IMTH
<i>L. casei</i>	LV61	FRIB
<i>L. casei</i>	475	CECT
<i>L. curvatus</i>	Lb726	IMTH
<i>L. delbrueckii</i>	LV13	FRIB
<i>L. fermentum</i>	Lb34	IMTH
<i>L. fermentum</i>	205	CECT
<i>L. mesentericus</i>	394	CECT
<i>L. plantarum</i>	221	CECT
	Lb577	IMTH
<i>L. reuteri</i>	MR371	FRIB
<i>L. sake</i>	Lb604	IMTH
<i>L. monocitogenes</i>	MR364	FRIB
<i>M. varians</i>	230	CECT
<i>S. hyalacidus</i>	237	CECT
<i>S. faecalis</i>	401	CECT
<i>S. faecalis</i> (var. <i>haverfordensis</i>)	184	CECT
<i>S. faecalis</i>	410	CECT
<i>S. enteritidis</i>	49	CECT
<i>S. carnosus</i>	148	CECT
<i>S. thermophilus</i>	10018	NCIB
<i>S. aureus</i>	99	CECT
	137	FR
	361	FR

Tabla III. 1. - (continuación)

Microorganismo Indicador	Cepa nº	Origen ^a
<i>List. monocytogenes</i>	5105	NCTC
	7973	NCTC
	L15 sv 1/2	FVM
	L11 sv 4	FVM
	Scott A	FVM
<i>C. parvityphens</i>	376	CECT
<i>C. botulinum</i>	551	CECT
<u>Bacterias Gram-negativas</u>		
<i>E. cloacae</i>	194	CECT
<i>E. coli</i>	BW545	MIT
<i>E. coli</i> /enteropatógeno	841	IEKC
<i>S. typhi</i>	409	CECT
<i>S. typhimurium</i>	443	CECT
	T91	CENAN
<i>Ps. fluorescens</i>	DC5	FRIB
	DC7	FRIB
	MT19	FRIB
<i>Y. enterocolitica</i>	WA	DHHS
	E20	NC
	14405	IPP

Abreviaturas: CECT, Colección Española de Cultivos tipo (Burjassot, Valencia); CENAN, Centro Nacional de Nutrición y Alimentación (Majadahonda, Madrid); DHHS, Dept. of Health and Human Services, (Washington DC, USA); FRI, Food Research Institute (Madison, USA); FRIB, Food Research Institute (Bristol, Gran Bretaña); FVM, Facultad de Veterinaria (Madrid); IEKC, International Escherichia and Klebsiella Centre (Copenhage, Dinamarca); IMTH, Institut für Mikrobiologie, Toxikologie und Histologie (Kulmbach, RFA); IPP, Institut Pasteur (Paris, Francia); MIT, Massachusetts Institute of Technology (Boston, USA); NCIB, National Collection of Industrial and Marine Bacteria (Aberdeen, Gran Bretaña); NCTC, National Collection of Type Cultures (Londres, Gran Bretaña).

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monopiato "Sauter" mod. S-1000 y las de precisión en balanzas analíticas "Sartorius" mod. 2443 y "Mikrowa" mod. 6620. Para equilibrar las muestras a centrifugar se utilizó una balanza biplato "Cebos" mod. 201.

Los ajustes y determinaciones de pH se llevaron a cabo con pHmetros "Crisen" mod. Digit 501 y "Radiometer" mod. 28.

Las esterilizaciones de los medios de cultivo y de las soluciones cuya naturaleza así lo permita se realizaron en autoclaves "Averly" y "Selecta" mod. 437-6. La esterilización del material de vidrio se efectuó por calor seco en una estufa de aire forzado "Heraeus" mod. KFTU-K. La esterilización de otras soluciones se llevaron a cabo por filtración con filtros "Millipore" de 0,22 y 0,45 μm de diámetro de poro.

Las homogenizaciones se realizaron en un homogenizador "Servall" mod. Omnit-mixer 17106.

Las centrifugaciones se efectuaron en una centrífuga refrigerada "Servall" mod. RC-5B, equipada con rotores SS-34 y 6SA y en la microcentrífuga "Heraeus" Christ, mod. Biofuge A, equipada con un rotor tipo 1220. Las ultracentrifugaciones de los gradientes de DNA en cloruro de cesio-bromuro se realizaron en una ultracentrífuga "Beckman", mod. L8-70 M, equipada con un rotor tipo 70.1.T1.

Las siembras microbianas se efectuaron en una cámara de flujo laminar "Telstar" mod. CE-A. Las incubaciones se efectuaron en estufas "Heraeus", mods. KB-500 y B6200 y "Selecta", mod. Termotronic 338, termostaladas a la

temperatura deseada y en un incubador-agitador orbital "Lab Line" mod. 35271. Los tratamientos térmicos e incubaciones que requerían un control más preciso de la temperatura se realizaron en baños de agua o de glicerina provistos de termostatos "Selecta", mod. Tectron.

El crecimiento de los cultivos microbianos se estimó por turbidometría, empleando un colorímetro "Klett-Summerson" mod. 800-3. Los recuentos microbianos se efectuaron en un contador de colonias "WTW" mod. BZG-24. Las observaciones microscópicas se realizaron en un microscopio óptico "Nikon", mod. L-ke, equipado con un dispositivo de contraste de fases.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros "Kontron", mod. Uvikon 820, e "Hitachi", mod. U-2000, registrándose los resultados en una impresora térmica "Kontron", mod. Uvikon LS Thermoprinter 4B.

Las muestras se conservaron en arcones congeladores "Kelvinator", mods. AC-550 y ACK-55 y "Liebherr", mod. GT6102, así como en frigoríficos "Aspes", "Kelvinator", mod. AKR y "Liebherr" y en un armario frigorífico termostatado a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ construido por una firma local.

Las liofilizaciones se efectuaron en un aparato "Terruzzi Melvisa", mod. TP-3.

En la detección de peróxido de hidrógeno de los medios de cultivo se emplearon placas de ELISA marca "Costar", mod. 3596 y la lectura espectrofotométrica de los pocillos de las mismas se efectuó en un lector de placas de ELISA "Titertek Multiskan", mod. Plus.

Las cromatografías de filtración en geles se realizaron utilizando columnas de diferentes dimensiones de las marcas "Pharmacia" y "Wright". Las fracciones cromatográficas se recogieron en colectores de fracciones "LKB-Bromma", mod. 7000 Ultrarac, y 2212 Heltrac.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico se realizaron en una cubeta de electroforesis "Bio-Rad", mod. Protean II, empleando como fuente de alimentación un aparato "Shandon", mod. SAE 2761.

Las electroforesis en geles de agarosa se efectuaron en una cubeta de electroforesis "BRL", mod. Horizon 58. La visualización de los plásmidos en los geles se realizó con un transiluminador de luz UV, mod. "UVP". Las bandas de DNA presentes en los tubos en los que se realizó la separación de los ácidos nucleicos, se observaron con una lámpara de luz UV "UVP", mod. UVL-56.

Como material general de laboratorio se han utilizado pipetas, micropipetas automáticas "Gillson", mods. P-20, P-200 y P-1000, agitadores, mecheros de gas, termómetros, etc. El material de vidrio empleado fue siempre del tipo "Pyrex".

III. 2. - MÉTODOS

III. 2. 1. - Medios de cultivo empleados en el crecimiento de los microorganismos

III. 2. 1. 1. - Medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias lácticas.

1. - Medio de de Mann, Rogosa y Sharpe (MRS, de "Oxoid").

Contiene:	g/l
Peptona	10,0
Extracto de carne	8,0
Extracto de levadura	4,0
Dextrosa	20,0
Acetato sódico	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Citrato triamónico	2,0
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
Tween 80	1 ml
pH 6.2	

Preparación

Se suspenden 52 g del medio MRS en 1000 ml de agua destilada calentando la solución hasta su disolución y esterilizándola en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Cuando el medio se depositaba en placas de Petri, a los componentes citados se les añadía 10,0 g/l de agar bacteriológico ("Difco").

2. - Medio mínimo-Triptosa (MTT)

Contiene:

	g/l
Triptosa	15,0
Dextrosa	10,0
Extracto de levadura	5,0
Cloruro sódico	2,0
Citrato amónico	2,0
Fosfato potásico dihidrogenado	1,0
Fosfato dipotásico	1,0
Sulfato magnésico	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Sulfato ferroso	0,01
Tween 80	1 ml
pH 6,1	

Preparación.

Una vez disueltos los componentes citados en 1000 ml de agua destilada, la preparación de este medio se continúa siguiendo las instrucciones descritas para el medio MRS (Sección III. 2. 1. 1.). Se empleó este medio por carecer de componentes complejos, lo que facilita la purificación de las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas.

III. 2. 1. 2. Medio de cultivo para el crecimiento de microorganismos indicadores distintos de las bacterias lácticas.

1. Caldo infusión de cerebro y corazón (BHI, "Oxoid").

Contiene:

	g/l
Extracto de cerebro	12,5
Extracto de corazón	5,0
Proteasa-peptona	5,0
Cloruro sódico	5,0
Dextrosa	2,0
Fosfato disódico	2,5
pH 7,4	

Preparación

Se suspenden 37 g del producto deshidratado en polvo en un litro de agua destilada. Se continúa como se describe a propósito del medio MRS (Sección III. 2. 1. 1.1).

III. 2. 1. 3. - Medio para cultivos mixtos de bacterias lácticas y microorganismos psicotrofos patógenos.

1. Caldo con Tween para todos los propósitos (APT. "Difco")

Contiene:	g/l
Triptona	12,5
Dextrosa	10,0
Extracto de levadura	7,5
Citrato sódico	5,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato dipotásico	5,0
Sulfato magnésico	0,8
Cloruro de manganeso	0,14

Sulfato ferroso	0,04
Clorhidrato de liamina	0,001
Tween 80	0,2
pH 6,7	

Preparación

Se suspenden 46,2 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada, suplementando el medio con 10 g de peptona ("Difco") y 8 g de extracto de carne ("Oxoid"). La preparación ulterior del medio es idéntica a la señalada para el medio MRS (Sección III. 2. 1. 1. 1). Cuando el medio se depositaba en placas de Petri se le añadían a su composición 12 g de agar ("Difco") por litro.

III. 2. 1. 4 - Medio de cultivo para el crecimiento selectivo de *Yersinia enterocolitica*

1. Agar selectivo para *Yersinia* (YSA)

a) Agar base *Yersinia* ("Oxoid").

Contiene:	g/l
Peptona	20,0
Manitol	20,0
Extracto de levadura	2,0
Piruvato sódico	2,0
Cloruro sódico	1,0
Desoxitosato sódico	0,5
Rojo neutro	0,03
Sulfato magnésico	0,01

Cristal violeta	0,001
Agar	12,5
pH 7,4 \pm 0,2	

b) Suplemento Selectivo de Yersinia (CIN, "Oxoid")

Cada vial contiene:

Cefsulodina	7,50 mg
Irgasan	2,00 mg
Novobiocina	1,25 mg

Preparación

Se suspenden 29 g de agar base en 500 ml de agua destilada calentando la solución hasta su disolución y esterilizándola en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio esterilizado se enfría hasta 50 °C y se le añade el contenido de un vial de Suplemento Selectivo de Yersinia, disuelto en 2 ml de agua destilada estéril y 1 ml de etanol.

III. 2. 1. 5. - Medio de cultivo para el crecimiento selectivo de *Listeria monocytogenes*

1. Agar selectivo para *Listeria* (I SAMM)

Contiene:	g/l
Caldo infusión de cerebro y corazón (BHI, "Oxoid")	37,0
Cloruro de litio	15,0
Esculina	0,75
Citrato amónico-férrico	0,5
Telurito potásico	0,2

Pentahidrato de ceftazidima	0,020
Sulfato de polimixina B	0,010
Clorhidrato de acriflavina	0,005
Agar	15,0

Preparación

Los cinco primeros componentes se suspenden en 900 ml de agua destilada, se calientan hasta ebullición y se esterilizan en un autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio esterilizado se enfría hasta 45 °C y se le añade el citrato amónico-férrico (esterilizado aparte en 70 ml de agua destilada) y las siguientes soluciones, esterilizadas por filtración: 10 ml de de telurito potásico al 2 %, 10 ml de una solución al 0,1 % de polimixina B en tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0 y 10 ml de una solución del 2 % de ceftazidima también en tampón de fosfato sódico 0,1 M, pH 6,0.

III. 2. 2. - Aislamiento y selección de las bacterias lácticas de los embutidos crudos curados.

Para el aislamiento de las bacterias lácticas se recogieron asépticamente 20 g de la porción central de chorizos comerciales que se homogeneizaron durante 10 minutos en 180 ml de un medio que contenía peptona (1 g/l) y cloruro sódico (8,5 g/l).

El recuento total de microorganismos presentes en el homogeneizado se realizó en placas de PCA suplementado con cloruro sódico (1 %). El agar de recuentos en placa (PCA, "Oxoid") contiene 5,0 g de tripton/l, 2,5 g de extracto de levadura/l, 1,0 g de dextrosa/l y 9,0 g de agar/l. Su pH final es de

7,0 y se prepara suspendiendo 17,5 g de polvo del medio deshidratado en un litro de agua destilada. El resto de las operaciones son idénticas a las indicadas para el medio MRS (Sección III. 2. 1. 1.). El recuento de bacterias lácticas se efectuó en agar MRS. Las placas de PCA y de MRS se incubaron a 32 °C durante 3 días.

De las colonias crecidas en agar MRS se seleccionaron 800 siguiendo el método aleatorio descrito por Ordóñez (1979). Las colonias seleccionadas se recogieron con un asa de platino y se sembraron en tubos que contenían caldo MRS, manteniendo los tubos durante 16 h. a 32 °C. A los cultivos obtenidos se les adicionó un 15 % de glicerol estéril y se almacenaron en congelación a -20 °C hasta su posterior utilización.

III. 2. 3. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas

III. 2. 3. 1. - Soluciones tampón empleadas.

1.) Tampón de fosfato 4 mM, pH 7,0.

a. Solución de Na_2HPO_4 4mM.

Contiene 0,76 g de Na_2HPO_4 en 1 litro de agua destilada.

b. Solución de NaH_2PO_4 4 mM.

Contiene 0,55 g de NaH_2PO_4 en 1 litro de agua destilada.

Preparación

Se añade la solución (b) a la (a) hasta que su pH alcanza el valor de 7,0

2) Tampón de fosfato 0,2 M, pH 6,2.

a. Solución de Na_2HPO_4 0,2 M.

Contiene 35,6 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (2 \text{H}_2\text{O})$ en 1 litro de agua.

b. Solución de NaH_2PO_4 0,2 M.

Contiene 27,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot (1 \text{H}_2\text{O})$ en 1 litro de agua destilada.

Preparación

Mezclar 408 ml de la solución (b) y 92 ml de la solución (a) en un matraz aforado y añadir agua destilada hasta alcanzar los 1000 ml.

3) Tampón de ácido cítrico-fosfato, pH 3,9.

a. Solución de ácido cítrico 0,1 M.

Contiene 19,2 g de ácido cítrico en un litro de agua destilada.

b. Solución de Na_2HPO_4 0,2 M (Sección III. 2.3.1.2. a).

Preparación

Mezclar 64,5 ml de la solución (a) con 35,5 ml de la solución (b).

4.) Tampón de fosfato-glucosa, pH 7,0

Contiene:

Solución de Na_2HPO_4 0,2 M (Sección III. 2. 3. 1. 2. a)	300 ml
Solución de NaH_2PO_4 0,2 M (Sección III. 2. 3. 1. 2. b)	200 ml
Dextrosa	2,5 g
Agua destilada	500 ml

III. 2. 3. 2. - Pruebas directas de antagonismoIII. 2. 3. 2. 1. - Prueba directa de antagonismo en pocillos

Para detectar la actividad inhibidora de las bacterias lácticas (LAB) aisladas de los embutidos crudos curados frente a los diferentes microorganismos indicadores (Tabla III. 1), se ideó un sistema consistente en utilizar placas de Petri con medio MRS sólido en las que se hicieron con un sacabocados pocillos de 7 mm de diámetro, cuyo fondo se tapizó con 10 μl del mismo medio. A continuación se depositaron 20 μl de los cultivos de las cepas LAB crecidos en caldo MRS, después de lavados y resuspendidos en el mismo medio y se relleno el pocillo con agar MRS. Inmediatamente después (actividad inhibidora directa) o tras incubar las placas a 32 °C durante 24 h (actividad inhibidora diferida), los microorganismos indicadores se depositaron en las placas a una concentración aproximada de 1×10^5 ufc/ml, de agar MRS cuando se trataba de bacterias lácticas y de agar BHI en el resto de los casos. Finalmente, las placas se incubaron a 32 °C durante 24 horas. Con esta técnica la inhibición ejercida por las bacterias lácticas en el microorganismo indicador, se manifiesta por la aparición de halos en la superficie de las placas, cuantificándose dicha inhibición como el área de la corona circular (mm^2) del halo de inhibición por unidad de densidad óptica de

los cultivos en unidades Klett y por 0,020 ml de medio de cultivo.

III. 2. 3. 2. 2. - Prueba directa de antagonismo por siembra en picadura.

Esta técnica se empleó cuando se pretendió evaluar la actividad inhibidora de un gran número de bacterias. Las colonias desarrolladas en placas de agar MRS se recogieron con palillos estériles y se replicaron por siembra en picadura en dos placas de agar MRS. En cada placa se depositaron 24 cepas y las placas se incubaron durante 6 horas a 32 °C para permitir a los aislados reiniciar su crecimiento. Después, en una de las placas en las que se sembraron por picadura las colonias seleccionadas, se depositó la cepa indicadora de *L. fermentum* CECT285 en 6 ml del agar MRS (0,8 % de agar), a una concentración de aproximadamente 3×10^5 células. Una vez incubadas las placas durante 24 h a 32 °C, se recuperaron, para su posterior estudio, las cepas que exhibían mayores halos de inhibición.

III. 2. 3. 3. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células.

III. 2. 3. 3. 1. - Preparación de los sobrenadantes

Las bacterias lácticas seleccionadas se cultivaron en caldo MRS durante 16-18 h a 32 °C, mientras que los sobrenadantes libres de células se obtuvieron centrifugando los cultivos a 12.000 g durante 10 minutos. El pH de los sobrenadantes se ajustó a 6,2 con NaOH 1 N y, a continuación, se filtraron por un filtro de 0,22 µm de diámetro de poro. Los filtrados se liofilizaron y antes de su utilización se concentraron 20 veces, resuspendiéndose en tampón de fosfato 4 mM, pH 7,0.

III. 2. 3. 3. 2. - Detección de la actividad inhibidora de los sobrenadantes.

Para detectar y cuantificar la actividad inhibidora se utilizaron discos de papel de filtro Whatman nº 3, de 7 mm de diámetro, que contenían 0,030 ml de sobrenadantes concentrados. Estos discos se colocaron en placas de Petri que tenían un pequeño fondo de agar base en el que se depositaron alrededor de 3×10^5 células de microorganismos indicadores en 6 ml de agar MRS, APT o BHI (0,8 % de agar en todos los casos). Las placas se incubaron a 32 °C durante 24 h y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se cuantificó midiendo las zonas de inhibición alrededor de los discos.

III. 2. 3. 4. - Actividad inhibidora de los extractos de los medios de cultivo sólidos en los que se desarrollaron las bacterias lácticas seleccionadas.

Las bacterias lácticas seleccionadas se sembraron en placas de agar MRS tanto en superficie como en profundidad, incubándose a 32 °C durante 24, 48 y 72 horas. El contenido de las placas se llevaba a bolsas de plástico que contenían 20 ml de un tampón de fosfato 2 M, pH 6,2, disgregándose manualmente el agar y manteniendo las bolsas en refrigeración durante 12 h. A continuación, el contenido de la bolsa se filtraba por un filtro de papel Whatman nº 54; el filtrado se centrifugaba a 12000 g durante 10 minutos, se ajustaba su pH a 6,2 con NaOH 0,1 N y se filtraba con un filtro Millipore de 45 µm de diámetro de poro. La actividad inhibidora de los extractos se determinó de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2, empleando *L. fermentum* CECT285 como microorganismo indicador.

III. 2. 3. 5 - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas.

La influencia de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas se evaluó permitiendo el desarrollo de colonias individuales de la cepa objeto de estudio en placas que tenían una doble capa de agar MRS, en las que se depositaron 0,2 ml de una solución de catalasa de 500 000 UI/ml (4.000 UI/ml de agar). A continuación se sembraron unas 5×10^5 células del microorganismo indicador (*L. fermentum* CECT285) en 6 ml de agar MRS. Las placas, una vez sembradas, se incubaron a 32 °C durante 24 horas. La disminución de la actividad inhibidora de las bacterias lácticas debida a la catalasa se determinó cuantificando la diferencia de diámetro entre los halos de inhibición de las placas problemas y los de las controles a las que no se les había adicionado catalasa.

III. 2. 3. 6 - Determinación del peróxido de hidrógeno de los medios de cultivo.

Para determinar en medios de cultivo líquidos la producción bacteriana de peróxido de hidrógeno se intentó desarrollar una técnica miniaturizada. La reacción, que se desarrollaba en los pocillos de una placa de ELISA, se realizaba con 50 µl de cada uno de los siguientes componentes: solución al 1 % de peroxidasa de rábano en agua destilada, sobrenadante de los cultivos y, como sustrato, solución en agua destilada de ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-sulfónico (ABTS) (15 mg/ml) en 10 ml de un tampón ácido cítrico-fosfato, pH 3.9. Transcurrido el tiempo establecido para la reacción, ésta se detuvo con 25 µl de ácido cítrico 0,1 M. La lectura de la absorbancia del contenido de los pocillos se realizó a 405 nm en un lector de placas de

ELISA

Para este ensayo, las bacterias lácticas se desarrollaron a 32 °C durante 2 días, en caldo MRS y en un medio mínimo de triptosa, así como a 5 y 32 °C durante 6 y 2 días en tampón de fosfato-glucosa, de pH 7,0. En todos los casos, los sobrenadantes se obtuvieron centrifugando los cultivos a 15 000 g durante 10 minutos ajustando su pH a 3,9 con NaOH 1 N.

La concentración de peróxido de hidrógeno de los cultivos se determinó por interpolación gráfica de la absorbancia a 492 nm en función de la concentración de peróxido de hidrógeno en µg/ml de medio.

III. 2. 4. - Identificación y caracterización bioquímica de algunas bacterias lácticas con actividad antimicrobiana

III. 2. 4. 1. - Morfología y tinción por el método de Gram

Los cultivos de las bacterias lácticas seleccionadas se tiñeron por el método Gram y se observaron microscópicamente para determinar su morfología así como sus afinidades tintoriales.

III. 2. 4. 2. - Prueba de la catalasa

La producción de catalasa se evaluó añadiendo una gota de peróxido de hidrógeno (110 vol) a una alícuota del cultivo a analizar. Como control positivo se empleó un cultivo de *S. aureus*. La prueba se basa en la descomposición del peróxido de hidrógeno por la catalasa dando agua y oxígeno, manifestándose este último por la presencia de burbujas.

III. 2. 4. 3. - Producción de gas a partir de glucosa

La producción de CO_2 a partir de la glucosa se evaluó de tres maneras diferentes:

1.) Introduciendo campanas de Durham en tubos con caldo MRS de cuya composición se suprime el citrato. Si las cepas producen gas durante la incubación de los tubos, éste se manifiesta por la presencia de burbujas en la campana.

2.) Colocando en los tubos de caldo MRS tapones de agar (0,75 % p/v) y observando al durante la incubación de aquéllos se produce un desplazamiento de los tapones debido a la presencia de gas.

3.) Verificando la presencia de burbujas al desarrollarse los cultivos seleccionados en tubos con agar hierro de Klieger ("Difco"); este medio contiene:

	g/l
Peptona	5,0
Proteosa	5,0
Extracto de carne	3,0
Extracto de levadura	3,0
Lactosa	10,0
Dextrosa	1,0
Cloruro sódico	5,0
Tiosulfato sódico	0,3

Sulfato ferroso	0,2
Rojo fenol	0,024
Agar	12,0
pH 7,4 \pm 0,2	

Preparación

Se suspenden los ingredientes del medio en agua destilada y se calienta hasta ebullición, distribuyéndolo posteriormente en tubos que se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. A continuación se dejan solidificar en pendiente. La producción de gas se observa por la formación de burbujas en el medio.

III. 2. 4. 4 - Hidrólisis de la arginina

1.) Caldo Arginina.

Contiene:	g/l
Peptona	10,0
Extracto de levadura	4,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato sódico	5,0
Citrato sódico	2,0
Sulfato magnésico	0,2
Sulfato de manganeso	0,05
L- Arginina	3,0
Tween 80	1,0

Preparación

Una vez disueltos los componentes del medio, éste se distribuye en tubos que se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

2) Reactivo de Nessler.

a.) Solución 1.

Contiene:

Yoduro potásico	7 g
Yoduro mercurico	10 g
Agua destilada	40 ml

b.) Solución 2.

Contiene 10 g de NaOH en 50 ml de agua destilada.

Preparación

Una vez preparadas las dos soluciones (y dejada enfriar la solución 2), se mezclan en un matraz aforado y se añade agua destilada hasta enrasar a 100 ml. Se deja que sedimente el precipitado, se decanta el líquido sobrenadante claro, que se guarda y se desecha el precipitado.

Sembradas las bacterias lácticas de interés en caldo de Arginina, se incuban a 32 °C durante 2 días; a 1 ml de estos cultivos se le añade 1 ml del reactivo de Nessler. La hidrólisis de la arginina, con formación de amoníaco, produce una alcalinidad que se manifiesta por el desarrollo de un color entre anaranjado y marrón.

III. 2. 4. 5. - Producción de ácido sulfhídrico.

III. 2. 4. 5. 1. - Técnica de Shay y Egan (1981).

1. Agar base de acetato de plomo ("Difco").

Contiene:	g/l
Peptona	15,0
Proteosa	5,0
Dextrosa	1,0
Acetato de plomo	0,2
Tiosulfato sódico	0,08
Agar	15,0
pH 6,6	

Preparación

Se suspenden 36 g del medio deshidratado, 1 ml de Tween 80 y 0.05 g de sulfato de manganeso en 1 litro de agua destilada. La suspensión se calienta hasta la ebullición y se esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. El medio esterilizado se deja enfriar hasta 45 °C para distribuirlo finalmente en placas.

Si las colonias desarrolladas en las placas incubadas a 32 °C durante 3 días producen ácido sulfhídrico, se observa un ennegrecimiento del medio.

III. 2. 4. 5. 2. - Agar hierro de Klieger

Los cultivos seleccionados se inocularon en tubos inclinados de agar

Hierro de Kileger, tanto en picadura como en estria. Los tubos se incubaron durante 7 días a 32 °C, manifestándose la producción de ácido sulfhídrico por un ennegrecimiento del medio.

III 2 4 6 - Prueba de Voges-Proskauer.

a.) Caldo MR-VP.

Contiene:	g/l
Peptona	7,0
Fosfato dipotásico	5,0
Dextrosa	5,0
pH 7,5	

b.) Solución de α -naftol en etanol.

Contiene:	
α -Naftol	6 g
Etanol	100 ml

c.) Solución de hidróxido potásico.

Contiene:	
KOH	40 g
Agua destilada	100 ml

Preparación

Una vez disueltos el medio (a) se distribuye en tubos que se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Sembrado el inóculo e incubados los

tubos a 32 °C, a 5 ml de los cultivos se añaden 0,5 ml de la solución (b.) y 0,5 ml de la (c) y se observa el cambio de coloración del medio. El desarrollo de un color rojo intenso se debe a la producción de acetil metil carbinol a partir de la dextrosa que, en presencia de KOH, reacciona con el α -naftol.

III. 2. 4. 7. - Fermentación de carbohidratos.

1.) Medio API CHL ("Biomérieux")

Contiene:	g/l
Peptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
Tween 80	1,0
Fosfato dipotásico	2,0
Acetato sódico	5,0
Citrato diamónico	2,0
Sulfato magnésico	0,20
Sulfato de manganeso	0,05
Bromocresol púrpura	0,17
pH 6,9-7,0	

2.) Tiras API 50 CH (Biomérieux).

Cada tira contiene los siguientes carbohidratos: 0. control; 1. glicerol; 2. eritritol; 3. D-arabinosa; 4. L-arabinosa; 5. ribosa; 6. D-xilosa; 7. L-xilosa; 8. adonitol; 9. β -metil D-xilósido; 10. galactosa; 11. glucosa; 12. fructosa; 13. manosa; 14. sorbosa; 15. ramnosa; 16. dulcitol; 17. inositol; 18. manitol; 19. sorbitol; 20. α -metil D-manósido; 21. α -metil D-glucósido; 22. N acetil glucosamina; 23. amígdalina; 24. arbutina; 25. esculina; 26. salicina; 27. celibiosa; 28. maltosa; 29. lactosa; 30. melibiosa; 31. sacarosa; 32. trehalosa;

33. inulina; 34. melicitosa; 35. rafinosa; 36. almidón; 37. glucógeno; 38. xilitol; 39. gentiobiosa; 40. D-turanosa; 41. D-lixosa; 42. D-tagatosa; 43. D-fucosa; 44. L-fucosa; 45. D-arabitol; 46. L-arabitol; 47. gluconato; 48. 2-cetogluconato y 49. 5-cetogluconato.

Procedimiento

Los cultivos seleccionados, desarrollados previamente en caldo MRS, se centrifugaron a 12000 g durante 10 minutos y el sedimento (las células) obtenido se resuspendió en medio API CHL. El sedimento resuspendido se depositó en microtubos en los que se encuentran los carbohidratos. La zona aeróbica de los microtubos (superficie) se cubrió con aceite de parafina para crear las condiciones de anaerobiosis requeridas. Las tiras con los distintos microtubos se incubaron a 32 °C, realizando dos lecturas de las mismas a las 24 y 48 h, respectivamente. La fermentación de los carbohidratos se manifiesta por un cambio de color del microtubo, debido a la producción anaeróbica de ácido, que es detectado por el indicador de pH incluido en el medio API CHL.

III. 2. 4. 8. - Tolerancia al cloruro sódico

La tolerancia de las bacterias seleccionadas a la sal se evaluó en caldo MRS suplementado con un 7 y un 10 % de NaCl, respectivamente. El medio una vez inoculado se incubó durante 6 días a 32 °C.

III. 2. 4. 9. - Tolerancia al pH de 3.9

El crecimiento de los cultivos a pH 3.9 se evaluó en caldo MRS cuyo pH se

había ajustado a 3,9 con HCl 1 N. El medio se incubó durante 5 días a 32 °C.

III. 2. 5. - Crecimiento y cinética del desarrollo de las bacterias lácticas seleccionadas a diversas temperaturas.

III. 2. 5. 1. - Crecimiento de los cultivos.

Las colonias seleccionadas se inocularon en tubos con caldo MRS y se incubaron a 4, 8, 15, 20 y 32 °C durante 7 días, 5 días, 30 h, 16 h y 12 h, respectivamente. El desarrollo de los cultivos se estimó por turbidometría a determinados intervalos de tiempo; con los datos obtenidos se calcularon los parámetros cinéticos del desarrollo microbiano que se describen en la sección III. 2. 5. 2.

III. 2. 5. 2. - Parámetros cinéticos del desarrollo microbiano.

III. 2. 5. 2. 1. - Velocidad específica de crecimiento (μ).

Se define como el incremento de la masa celular de los cultivos con respecto al tiempo de incubación y se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión de una gráfica que representa la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación (figura 3. 1).

De la figura 3. 1 se deduce que:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

siendo "x" la densidad óptica de los cultivos en unidades Klett, "t" el tiempo de incubación en horas y " μ " la velocidad específica de crecimiento.

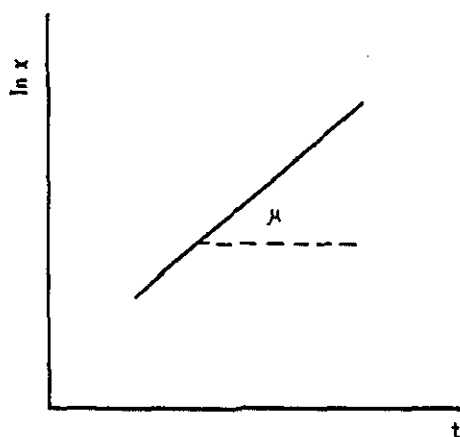


Figura 3. 1. Representación gráfica teórica del incremento de la masa celular de los cultivos en función del tiempo de incubación.

Asimismo,

$$\int_{x_1}^{x_2} \frac{dx}{x} = \int_0^t \mu dt; \quad \ln \frac{x_2}{x_1} = \mu t; \quad \mu = \frac{\ln \frac{x_2}{x_1}}{t}$$

III. 2. 5. 2. 2. - Tiempo de duplicación (t_d)

Se define como el tiempo que tardan los cultivos en duplicar su masa celular a una temperatura de incubación determinada. Así, partiendo de la expresión:

$$\ln \frac{x_2}{x_1} = \mu t, \text{ cuando } x_2 = 2x_1, \ln \frac{2x_1}{x_1} = \mu t_d; \ln 2 = \mu t_d; t_d = \frac{0,693}{\mu}$$

III. 2. 5. 2. 3. - Número de generaciones por hora (g/h)

Este término indica el número de generaciones microbianas de los cultivos en una hora a una temperatura determinada, y su valor se corresponde con el inverso del tiempo de duplicación (t_d).

III. 2. 6. - Síntesis de metabolitos finales

III. 2. 6. 1. - Determinación de los ácidos L(+) y D(-) láctico

III. 2. 6. 1. 1. - Fundamento.

El dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD) oxida los ácidos L(+) y D(-) láctico a piruvato. La oxidación de los ácidos L(+) y D(-) láctico requiere como catalizadores la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) y la D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), respectivamente (1), (2).



El equilibrio de esta reacción se encuentra casi completamente desplazado hacia el lactato. Sin embargo, por acción del piruvato formado en una reacción catalizada por el enzima alanin transaminasa (ALT) en presencia de L-glutamato, el equilibrio puede desplazarse en favor del piruvato y del NADH (3):



La determinación cuantitativa de los ácidos L(+) y D(-) láctico se basa en que la cantidad de NADH formado en las reacciones (1) y (2) es estequiométrica con la concentración de dichos ácidos; el aumento de NADH se determina espectrofotométricamente a 340 nm.

III. 2. 6. 1. 2. - Preparación de las muestras.

Los sobrenadantes destinados al análisis de los ácidos L(+) y D(-) láctico se obtuvieron centrifugando a 15.000 g durante 10 minutos los cultivos en caldo MRS. Posteriormente, se prepararon alícuotas de 5 ml de sobrenadantes a los que se les adicionaron 2 ml de ácido perclórico 1 N y 3 ml de agua destilada. La mezcla se dejó reposar 15 minutos, se ajustó su pH a 10-11 con KOH 2 M y se dejó estar a 4 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo se filtraron por un filtro de papel "Whatman" nº 2. Los sobrenadantes de los cultivos en caldo APT no requerían más tratamiento posterior que su

centrifugación a 16000 g durante 10 minutos

III. 2. 6. 1. 3. - Procedimiento

En las cubetas del espectrofotómetro se mezclaron 0,5 ml de tampón de glicina (0,6 mol/l), L-glutamato (0,1 mol/l), de pH 10, 0,1 ml de NAD, 0,490 ml de agua bidestilada, 0,01 ml de una solución que contiene 1100 U. l. de alanil transaminasa (ALT) y 0,010 ml del sobrenadante a analizar. La mezcla se deja reaccionar 5 minutos, al cabo de los cuales se le añade 0,010 ml de una solución que tiene 3800 U.l. de L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) o de D-lactato deshidrogenasa (D-LDH), dependiendo de que se desee determinar el ácido L(+)-láctico ó D(-)-láctico. Tras agitar la mezcla suavemente, se deja reaccionar 20 minutos y, a continuación, se determina su absorbancia a 340 nm frente a un blanco. El ácido L(+)-láctico ó D(-)-láctico presente en las muestras se calculó a partir de la ecuación de regresión de una gráfica que representaba los valores de la absorbancia a 340 nm en función de concentraciones conocidas (entre 0,01 y 0,20 mg/ml) del isómero correspondiente del ácido láctico. Las curvas patrones se repetían cada vez que se renovaban los reactivos.

III. 2. 6. 2. - Determinación del diacetilo-acetoina

Se llevó a cabo según la técnica descrita por Westerfield (1945).

III. 2. 6. 2. 1. - Fundamento.

Este método es una adaptación del test de Voges-Proskauer. Determina, por tanto, la suma de acetoina y diacetilo, basándose en la oxidación de la

acetoina a diacetilo por acción de un álcali y en la reacción, en medio básico, del diacetilo con los grupos guanidínicos de la creatina, dando lugar a la formación de un compuesto de color rosa que tiene su absorbancia máxima a 540 nm.

III. 2. 6. 2. 2. - Preparación de las muestras.

Las muestras se prepararon de la forma descrita en la sección III. 2. 6. 1. 2.

III. 2. 6. 2. 3. - Preparación de los reactivos.

1.) Solución de creatina al 0,5 % (p/v) en agua destilada.

2.) Solución de α -naftol al 5 % en NaOH 2,5 N.

III. 2. 6. 2. 4. - Procedimiento.

A 2 ml de la muestra con un contenido de acetoina o diacetilo entre 1 y 12 μ g/ml, se le añaden 0,4 ml de la solución de creatina y otros 0,4 ml de la solución de α -naftol. La absorbancia de las muestras se determinaba a 540 nm tras 1 h de incubación de las mismas. La absorbancia de las muestras se refirió a la de la curva patrón, preparada cada vez que se renovaban los reactivos.

III. 2. 7. - Identificación y curado de plásmidos de algunos lactobacilos con actividad antimicrobiana.

III. 2. 7. 1. - Identificación de plásmidos.

III. 2. 7. 1. 1. - Géles, tampones y soluciones empleadas

1.) Tampón T.

Contiene 3,15 g de Tris-HCl 0,02 M en 1 litro de agua destilada. El pH se ajusta a 8,2 con NaOH 1 N.

2.) Tampón TE.

Contiene 1,57 g de Tris-HCl y 0,37 g de EDTA por litro de agua destilada. Su pH se ajusta a 8,0 con NaOH 1 N.

3.) Tampón TES.

Contiene 6,05 g de Tris-HCl, 1,86 g de EDTA y 14,61 g de NaCl por litro de agua destilada.

4.) Tampón TEG.

Contiene 3,16 g de Tris-HCl, 3,72 g de EDTA y 9,0 g de glucosa por litro de agua destilada. Su pH se ajusta a 8,0 con NaOH 1 N.

5.) Tampón TBE.

Contiene 108 g de Tris, 55 g de ácido bórico y 40 ml de una solución de EDTA 0,5 M, pH 8,0 por cada litro de agua destilada.

6.) Soluciones desproteinizantes

a. Solución FC.

Contiene:

Fenol	500 g
Cloroformo	500 ml

8-Hidroxiquinolina	0,5 g
Alcohol isoamílico	20 ml
Tris-HCl, 10 mM, pH 7,5	15 ml

Al mezclar los componentes de la solución FC debe recordarse que el fenol es muy corrosivo. La hidroxiquinolina es un antioxidante que evita la oxidación del fenol siendo también un débil quelante de iones metálicos y un inhibidor parcial de la enzima RNasa. Adicionalmente, su color amarillo proporciona una forma eficaz de identificar las fases líquidas separadas. El cloroformo desnaturaliza las proteínas, mientras el alcohol isoamílico facilita la separación entre las fases líquidas y reduce la formación de espuma durante la extracción.

b. Solución CA.

Contiene:

Cloroformo	480 ml
Alcohol isoamílico	20 ml

7.) Gel de agarosa 0,7 %.

Contiene:

Agarosa	0,1 g
Tampón TBE	1 ml
Agua destilada	14 ml

Preparación

Se mezclan los tres componentes y se calientan hasta que la solución permanece transparente. Luego se enfría hasta 50 °C y se vierte en un molde.

en el que con ayuda de un "peine" se elaboran unos pocillos en la matriz del gel.

8.) Tampón de electroforesis.

Se mezclan 10 ml del tampón TBE y 90 ml de agua destilada.

9.) Solución de Cloruro de cesio.

Contiene:

CsCl	26,32 g
Tampón TE	23,26 ml

III. 2. 7. 1. 2. - Lisis celular por el método de Chassy.

Este método se basa en los descritos por Chassy (1976) y Chassy y Giuffrida (1980). La lisis se realiza con polietilén glicol, lisozima y dodecil sulfato sódico (SDS). La lisis celular es un paso crítico, previo a cualquier método de aislamiento de DNA plasmidico. La metodología es la siguiente:

1. El microorganismo a analizar se cultiva durante 16-18 h a 32 °C en 100 ml del caldo MRS, recogiendo las células por centrifugación a 10000 g durante 10 minutos, las cuales se lavan con 10 ml del tampón T.

2. El sedimento se resuspende en 2,5 ml del tampón T y, tras resuspenderlo perfectamente, se le añaden 5 ml de una solución de polietilén glicol al 24 % en agua destilada y 0,3 ml de una solución de lisozima en el tampón T (30 mg/ml). Mezclar bien e incubar a 37 °C durante 1 h.

3. Se recoge de nuevo el sedimento por centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, se resuspende en 10 ml del tampón TE, se le añade 1 ml de una

solución de SDS al 10 % y se incuba a 37 °C durante 15 minutos, quedando de esta manera el lisado listo para su procesamiento posterior.

III. 2. 7. 1. 3 - Aislamiento del DNA plasmídico por el método de Currier y Nester.

El método empleado sigue en líneas generales el descrito por Currier y Nester (1976). Incluye el empleo de un álcali que, además de desnaturalizar el DNA, termina de lisar las células en el caso de que la acción de la lisozima y el SDS hubiera sido insuficiente. Sin embargo, para el último paso se utiliza una precipitación alcohólica diferente.

1. El pH del lisado obtenido previamente (III. 2. 7. 1. 2) se ajusta a 12,45 con NaOH 1 N. La base se añade lentamente y agitando continuamente, ya que este es un paso crítico y fundamental para el correcto desenlace del experimento. La acción del álcali se mantiene durante 15 minutos.

2. Transcurrido dicho tiempo, el lisado se neutraliza con un volumen de Tris-HCl 2 M igual a dos veces el volumen de NaOH 1 N empleado y se le añade un 3 % de NaCl para eliminar, en lo posible, el DNA cromosómico de elevado peso molecular. La solución se agita durante unos minutos.

3. A las muestras se les añade un volumen de la solución FC igual al volumen de muestra del que se partió. La mezcla se agita hasta obtener una emulsión y se somete a centrifugación a 10.000 g durante 10 minutos, obteniéndose dos fases de las que sólo se conserva la superior (fase acuosa).

4. La fase acuosa se extrae con un volumen igual de solución CA y una

vez recuperada por centrifugación como en el punto anterior, se le añade el doble de su volumen de etanol para precipitar el RNA y el DNA. La muestra se mantiene durante 16-18 h a -20°C .

5. El precipitado alcohólico se recoge por centrifugación (12000 g, 30 minutos), se seca a vacío durante 10 minutos y se disuelve en 5 ml de tampón TES.

6. A la solución anterior se le añaden 50 μl de una solución de Rnasa (10 mg/ml) y se incuba 1 h a 55°C . A continuación se le añaden 50 μl de solución de SDS al 10 % y 50 μl de solución de proteinasa K (10 mg/ml). La mezcla se incuba de nuevo durante 1 h a 55°C .

7. La preparación se extrae, sucesivamente, con solución FC y con solución CA manteniendo la muestra 16-18 h a -20°C .

8. Finalmente, el DNA aislado se recoge por centrifugación (12000 g, 30 minutos) y se resuspende en 0,5 ml de tampón TE.

Las muestras preparadas de la manera descrita pueden destinarse a la visualización directa del DNA obtenido por electroforesis en geles de agarosa o para intentar una mayor purificación del DNA plasmídico mediante centrifugación hasta el equilibrio en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio (CsCl-BrEt) y diálisis posterior.

III. 2. 7. 1. 4. - Purificación del DNA plasmídico mediante centrifugación hasta el equilibrio en gradientes de CsCl-BrEt y diálisis posterior.

En ocasiones, el DNA plasmídico se purificó por ultracentrifugación en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio (CsCl-BrEt). Dado que la composición en nucleótidos del DNA plasmídico y del cromosómico son iguales, no pueden separarse en función de su densidad. Sin embargo, se puede provocar una diferencia en la densidad de los mismos, utilizando bromuro de etidio, compuesto fluorescente que se une al DNA intercalándose entre los pares de nucleótidos, alargando así la molécula y haciéndola menos densa. El DNA cromosómico y el plasmídico tienen una conformación diferente, por ello la forma plasmídica, que está superenrollada, permite menos intercalaciones de bromuro de etidio, lo que le da una densidad aparente mayor, permitiendo que el DNA cromosómico y las formas plasmídicas abiertas se separen en un gradiente de densidad de CsCl-BrEt. El procedimiento empleado fue el siguiente:

- El DNA plasmídico aislado (Secciones III. 2. 7. 1. 2 y III. 2. 7. 1. 3) se precipita por centrifugación (12.000 g, 30 minutos), se resuspende en 1,25 ml de tampón TE y se deposita en tubos de centrifuga de 13 ml de capacidad. Posteriormente a cada tubo se le añaden 4 ó 5 ml de una solución de CsCl (13,15 g en 11,6 ml de tampón T) y 0,225 ml de una solución de BrEt (10 mg/ml), completando el volumen del tubo con solución de CsCl. La abertura de los tubos se cierra con un sellador a calor, y se centrifugan a vacío en una ultracentrífuga a 120.000 g durante, aproximadamente, 60 h a 10 °C.

- Los tubos una vez centrifugados se examinan con luz UV para observar las diferentes bandas de DNA. La banda deseada se extrae con ayuda de una jeringa, cuya aguja se inserta justo por debajo de la banda. El bromuro de etidio del DNA recuperado se extrae lavando la muestra de 3 a 5 veces con un

volumen igual de alcohol isoamílico saturado con CsCl; posteriormente el CsCl residual se extrae dializando las muestras durante 5 h a 2 °C en 2 l de tampón TE al 10 % y con agitación. A continuación se reemplaza este tampón por otro recién preparado y se dejan las muestras en las mismas condiciones durante aproximadamente 16 h. Después de retirar las muestras de las membranas de diálisis, se les añade un volumen igual de etanol y se mantienen durante 16-18 h a -20 °C. Las muestras ya están preparadas para la visualización del DNA plasmídico por electroforesis en geles de agarosa.

III. 2. 7. 1. 5. - Técnica miniaturizada y rápida de aislamiento del DNA plasmídico.

Este método es una modificación del descrito por Birnboim y Doly (1979) para *E. coli*. Las modificaciones las realizó Gasson (1989) para adaptarlas a los lactobacilos. La lisis se realiza con lisozima y SDS en presencia de NaOH. La neutralización tiene lugar en presencia de acetato sódico, lo que propicia la precipitación del DNA monocatenario (formado fundamentalmente por fragmentos de DNA cromosómico), del RNA de elevado peso molecular y de las proteínas que forman complejos con el SDS. La metodología utilizada es la siguiente:

1. La cepa a analizar se cultiva durante 16-18 h a 32 °C en 10 ml de caldo MRS. Las células se recogen por centrifugación (4.500 g, 10 minutos), se lavan en 1 ml del tampón T y se resuspenden en 0,25 ml del mismo tampón al que se le añaden 0,5 ml de una solución de polietilén glicol al 24 % y 0,2 ml de una solución de lisozima en tampón T (30 mg/ml). La mezcla se incuba 1 h a 37 °C.

2. A continuación se centrifuga a 9.000 g durante 10 minutos. El sedimento se resuspende en 200 µl de tampón TE6 y se le añaden 400 µl de solución de NaOH 0,2 M con SDS (1 X), manteniendo la mezcla durante 5 minutos en un baño de hielo picado.

3. Transcurrido el tiempo citado se añaden a la mezcla 300 µl de acetato sódico 3 M. El contenido del tubo se mezcla invirtiéndolo suavemente, volviéndolo a depositar en un baño de hielo, esta vez durante 10 minutos.

4. Los sobrenadantes se obtienen por centrifugación de las mezclas anteriores a 9.000 g durante 10 minutos, realizándose la extracción dos veces, la primera con 500 µl de solución FC y la segunda con otros 500 µl de solución CA.

5. La precipitación final del DNA se realiza adicionando a los extractos obtenidos en el paso anterior 900 µl de etanol; a continuación se centrifuga a 9.000 g durante 10 minutos y se mantienen durante 18-24 h a -20 °C.

6. El sobrenadante resultante en el punto anterior se decanta con mucho cuidado y el sedimento obtenido se mantiene a vacío en un desecador durante 5 minutos, resuspendiéndolo en 50 µl de tampón TE. Tras añadir 10 µl de solución de RNasa (10 mg/ml) y después de una incubación a 37 °C durante 1 h, ya no puede visualizar el DNA plasmídico.

III. 2. 7. 1. 6. - Visualización del DNA plasmídico por electroforesis en geles de agarosa.

Los grupos fosfato del DNA, a pH neutro o alcalino, confieren a las

moléculas una carga negativa uniforme. Cuando en estas condiciones el DNA se coloca en un campo eléctrico se desplaza en dirección del ánodo con una fuerza constante e independientemente de la composición en bases del mismo. Las moléculas de DNA incluidas en un gel de agarosa atraviesan los poros del gel de manera que las moléculas mayores tienen más dificultad para desplazarse que las más pequeñas. Se admite que, dentro de ciertos límites, la migración de las moléculas de DNA lineales de cadena doble en el gel de agarosa, es inversamente proporcional al logaritmo decimal de su peso molecular (Helling y col., 1974).

La conformación del DNA también influye en su movilidad en los geles, por ello las moléculas de igual masa migran a velocidades diferentes, dependiendo de que su forma sea superenrollada, circular abierta o lineal. La movilidad relativa del DNA se ve influenciada por otros parámetros, como concentración de agarosa, fuerza iónica del tampón utilizado, diferencia de potencial de la corriente aplicada y cantidad de superhélices del DNA (Johnson y Grosman, 1977).

La electroforesis se realizó en geles de agarosa (0,7 %) a los que se adicionaban 5 μ l de una solución de BrEt (10 mg/ml) para visualizar las bandas de DNA. En los pocillos abiertos en el gel se colocaron 10 μ l de las muestras a analizar a las que previamente se les había añadido una gota de colorante Ficoll al 10 % para visualizar su desplazamiento por el gel. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a 200 V. Como patrones para calcular el peso molecular aparente de los plásmidos visibles se empleó una solución de DNA del bacteriófago "lambda".

Los plásmidos se visualizaron en el gel con un transiluminador de luz UV

situado en una cámara oscura. Los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid empleando una película tipo 667.

III. 2. 7. 2. - Curado o eliminación de plásmidos

Los plásmidos son moléculas extracromosomales de DNA circular de doble cadena que se autorreplican independientemente del cromosoma de la célula hospedadora. A pesar de ello, la mayoría de los plásmidos son estables y requieren el empleo de agentes curantes u otros procedimientos (temperaturas elevadas, crecimiento en ausencia de timina) para incrementar su eliminación de las células hospedadoras. El término curado se utiliza como sinónimo del de eliminación de plásmidos. Trevors (1985), ha publicado una revisión muy completa sobre aspectos bioquímicos y genéticos de la curación de plásmidos.

Uno de los agentes curantes más utilizados es la acriflavina, agente intercalante que tiene la propiedad, como el naranja de acridina y el bromuro de etidio, de introducirse entre los nucleótidos de DNA e inducir errores en la replicación. Utilizados a concentraciones que no impiden totalmente el desarrollo de los microorganismos, inhiben la replicación de los plásmidos.

En cada una de las estirpes de las bacterias lácticas de interés se determinó la concentración máxima de acriflavina que permitía su desarrollo en 10 ml de caldo MRS. Las experiencias se realizaron tratando 10 ml de los cultivos con 5 - 20 μg de acriflavina por ml de medio, en función de la diferente sensibilidad de los microorganismos del cultivo al agente curante. Los cultivos se sometieron a 3 tratamientos consecutivos de 24 h con acriflavina; tras cada tratamiento se determinó la actividad inhibidora de

100 colonias de cada cultivo frente a *L. fermentum* CECT285. Las colonias que ya no mostraban actividad inhibitora se recogieron y conservaron a -20 °C para determinar la presencia o ausencia de plásmidos o los posibles cambios ocurridos en su perfil plasmídico.

III. 2. 8. - Antagonismo de los cultivos mixtos de *L. sake* 23 y *L. sake* 148 con microorganismos psicrotrofos productores de toxinfeciones alimentarias.

Los microorganismos psicrotrofos empleados fueron tres cepas de *V. enterocolitica* (WA, E20 y 14405) y tres de *List. monocytogenes* (7973, L11 sv 4 y Scott A) (Tabla III. 1).

III. 2. 8. 1. - Siembra de los microorganismos.

Las cepas de *L. sake* empleadas se cultivaron con las cepas de *V. enterocolitica* y *List. monocytogenes* en frascos que contenían 200 ml de caldo APT. Como inóculos se emplearon aproximadamente 1×10^5 ufc/ml para los lactobacilos y alrededor de 1×10^3 ufc/ml para los microorganismos psicrotrofos. Las temperaturas de incubación elegidas fueron las de 4, 8, 15 y 24 °C, utilizando también la de 32 °C en las experiencias en las que intervenían las cepas de *List. monocytogenes*. Los cultivos se incubaban hasta que los lactobacilos alcanzaban la fase estacionaria de desarrollo.

III. 2. 8. 2. - Análisis microbiológicos y bioquímicos.

A determinados intervalos de tiempo se tomaron de los cultivos alícuotas de 0,1 ml que se depositaron en placas de agar APT para realizar el

recuento total, en agar MRS para el recuento de lactobacilos y en los agares YSA, suplementado con CIN, para el recuento de yersinias y en el LSAM para el recuento de listerias. Una vez sembradas, las placas de agar APT y MRS se incubaron durante 48 h a 32 °C, las de agar YSA durante 72 h a 24 °C y las de LSAM durante 72 h a 37 °C. Asimismo, en cada alícuota se determinó el desarrollo de los cultivos por turbidometría, su pH y la concentración de ácidos L(+) y D(-)-láctico.

III. 2. 9 - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449.

Una de las bacterias lácticas aisladas, que identificamos tentativamente como *L. sake* 449, mostraba una potente actividad antimicrobiana exocelular por lo que se sometió a diversas experiencias para caracterizarla parcialmente.

III. 2. 9. 1. - Efecto de diversas enzimas proteolíticas en la actividad inhibidora de *L. sake* 449.

Para determinar la sensibilidad de la actividad inhibidora a los enzimas proteolíticos tripsina, pepsina, papaína, proteasa II y proteasa XIV, 60 µl de los sobrenadantes concentrados, libres de células, se depositaron en pocillos de placas de ELISA que contenían 60 µl de soluciones de los diversos enzimas (2 mg/ml), de tal manera que la concentración final del enzima en cada pocillo fue de 1 mg/ml. La actividad antimicrobiana residual de los pocillos se determinó tras 2, 6 y 20 h de incubación de las placas a 37 °C, según el método descrito en la sección III. 2. 3. 2.

III. 2. 9. 2. - Cinética de termodestrucción de la actividad inhibidora de *L. sake* 449.

III. 2. 9. 2. 1. - Tratamiento térmico

Viales de vidrio (10 x 30 mm) herméticamente cerrados con 0,1 ml del sobrenadante concentrado de *L. sake* 449, se calentaron a 80, 100, 121, 135 y 150 °C en un baño de glicerina termostatado durante intervalos de tiempo variables en función de la temperatura de calentamiento. Finalizado el tratamiento térmico las muestras se enfriaron rápidamente en un baño de hielo picado y se determinó la actividad antimicrobiana residual de las muestras calentadas de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 1.

III. 2. 9. 2. 2. - Parámetros cinéticos de termodestrucción.

A) Valor "D" o tiempo de reducción decimal.

Se define, arbitrariamente, como el tiempo necesario para reducir en un 90 % la actividad inhibidora inicial del sobrenadante concentrado de *L. sake* 449 a una temperatura determinada, y se corresponde con el tiempo en el que la curva de supervivencia atraviesa un ciclo logarítmico. El término se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión de una gráfica de termodestrucción, que representa el logaritmo del porcentaje de la actividad inhibidora inicial en función del tiempo de calentamiento (figura 3. 2). De la figura 3. 2, se deduce que:

$$\log x = -kt + C$$

siendo "x" el % de actividad inhibidora residual; "k" la constante de inactivación en min^{-1} y "t" el tiempo de calentamiento de las muestras.

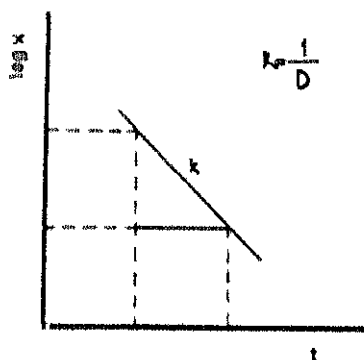


Figura 3.2 - Representación gráfica teórica de la actividad inhibidora en función de la temperatura de calentamiento.

Además:

$$(\log x_2 - \log x_1) = -k(t_2 - t_1)$$

$$k = \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_2 - t_1}, \quad \frac{1}{D} = \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_2 - t_1}, \quad D = \frac{t_2 - t_1}{\log x_2 - \log x_1}$$

B) 1.1/2

Se define como el tiempo en el que la actividad inhibidora inicial se

reduce en un 50 % a una temperatura determinada. El término puede calcularse gráficamente (figura 3. 3), representando la variación de la actividad inhibidora inicial en función del tiempo de calentamiento, o bien matemáticamente, asumiendo que el cambio de la actividad inhibidora

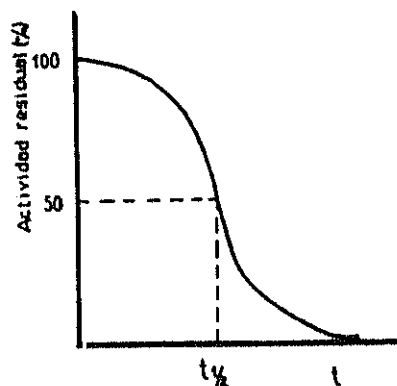


Figura 3. 3. - Representación gráfica teórica de la actividad inhibidora en función del tiempo de calentamiento.

con respecto al tiempo es función de la actividad inhibidora inicial (ecuaciones 1 y 2),

$$-\frac{dx}{dt} = kx \quad (1)$$

$$-\frac{dx}{x} = k dt \quad (2)$$

donde "x" representa la actividad inhibidora, "t" el tiempo de calentamiento a una determinada temperatura y "k" la constante de inactivación de la actividad inhibidora en min^{-1} .

Integrando la expresión (2) entre dos valores de x diferentes (x_0 y x) a

(t_0 y t) y siendo x_0 la actividad inhibidora inicial en el tiempo t_0 , resulta:

$$-\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = k \int_{t_0}^t dt; \ln \frac{x_0}{x} = k(t - t_0) \text{ ó } 2,3 \log \frac{x_0}{x} = k(t - t_0)$$

$$\text{Si } x = 50, \quad 2,3 \log \frac{100}{50} = k t_{1/2}; \quad t_{1/2} = \frac{2,3 \log 2}{k}; \quad t_{1/2} = \frac{0,693}{k}$$

C) Valor "Z"

Se define arbitrariamente como la temperatura necesaria para disminuir el valor "D" en un 90 %, y se calcula a partir de la ecuación de la recta de regresión, obtenida al representar gráficamente el logaritmo de los valores "D" en función de la temperatura a la que fueron obtenidos (figura 3.4).

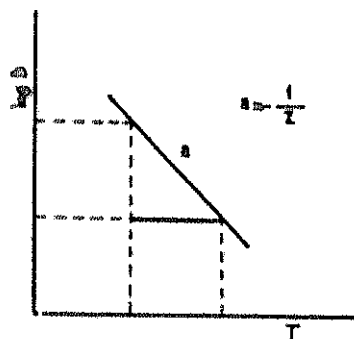


Figura 3. 4 - Representación gráfica teórica de los valores "D" en función de la temperatura.

De la figura 3. 4 se deduce que:

$$\log D = a T + C$$

donde "D" es el tiempo de reducción decimal a una determinada temperatura y "T" es la temperatura del tratamiento térmico en °C.

$$\text{Si por definición, } a = -\frac{1}{z}, \quad \log D = -\frac{1}{z} T + C$$

$$\log D_2 - \log D_1 = -\frac{1}{z} (T_2 - T_1), \quad \log D_2 - \log D_1 = \frac{1}{z} (T_1 - T_2)$$

$$z = \frac{T_1 - T_2}{\log D_2 - \log D_1}$$

III. 2. 9. 3. - Efecto del medio de cultivo en la actividad inhibidora de *L. sake* 449.

Para evaluar el efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana de *L. sake* 449, se sembró en diversos medios de cultivo que se incubaron a 32 °C; fueron los siguientes:

1.) Medio de APT

2.) Medio de APT con las siguientes suplementaciones:

a) con 10 g de peptona/l y 8 g de extracto de carne/l (APL)

b) con 8 g de extracto de carne/l (AL)

c) con 10 g de peptona/l (AP)

3.) Medio BHI

4.) Medio BHI con las mismas suplementaciones antedichas:

- a) BBL
- b) BL
- c) BP

5.) Medio mínimo con las siguientes suplementaciones:

- a) con 15 g de proteosa/l y 15 g de peptona/l (MPP)
- b) con 15 g de triptona/l (MONA)
- c) con 15 g de triptosa/l (MOSA)
- d) con 15 g de caseína/l (MMC)
- e) con 15 g de peptona/l (MMP)
- f) con 15 g de extracto de carne/l (MML)

Terminada la incubación se prepararon los sobrenadantes concentrados libres de células y se determinó su actividad antimicrobiana de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3.

III. 2. 9. 4. - Mecanismo de acción de la sustancia inhibidora producida por *L. sake* 449.

0,5 ml del sobrenadante concentrado de un cultivo de *L. sake* 449 se depositaron en 5 ml de una siembra recién hecha de *L. fermentum* CECT285 (5×10^5 ufc/ml) en medio APT. Los cultivos se mantuvieron a 32 °C durante 5 h, y a continuación alícuotas de dicho cultivo se depositaron en placas de MRS. Como control se realizó una experiencia similar en la que al cultivo del microorganismo indicador se le añadieron 0,5 ml del sobrenadante concentrado de un cultivo de *L. sake* 23, microorganismo cuyos sobrenadantes concentrados no mostraron actividad inhibidora detectable alguna.

El mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 449 se consideraba bactericida cuando se observaba una disminución en la viabilidad del microorganismo indicador y bacteriostática, cuando el número de ufc/ml del microorganismo indicador permanecía estacionario respecto de su cifra inicial.

III. 2. 10. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449.

III. 2. 10. 1. - Cromatografía de filtración en geles.

Esta técnica cromatográfica se basa en la separación de las moléculas por su tamaño molecular.

III. 2. 10. 1. 1. - Soluciones tampón empleadas.

1.) Tampón de ácido cítrico-fosfato, pH 5,6.

(a.) Solución de ácido cítrico 0,1 M.

Contiene 21,01 g de ácido cítrico ($1\text{ H}_2\text{O}$) por litro de agua destilada.

(b.) Solución de Na_2HPO_4 0,2 M.

Contiene 28,4 g de Na_2HPO_4 por litro de agua destilada.

Preparación

Se mezclan 42 ml de ácido cítrico 0,1 M con 58 ml de Na_2HPO_4 0,2 M.

2.) Tampón de ácido cítrico-fosfato, pH 5,6, con urea 0,1 M, 1 M y 6 M.

A la solución tampón base (sección III. 2. 10. 1. 1. 1), se le añaden, respectivamente, 6 g, 60 g ó 360 g de urea por litro de solución.

III. 2. 10. 1. 2. - Geles.

El Sephadex es un polímero resultante de la formación de enlaces cruzados entre las moléculas de dextrano y de epíclorhidrina. Debido al gran número de grupos hidroxilo de su molécula este polímero es muy hidrofílico y se hincha fácilmente en el agua y en soluciones electrolíticas. Los tipos de Sephadex difieren en su grado de entrecruzamiento, por lo que se utilizan para alcanzar fraccionamientos con diversos intervalos de tamaño molecular; en el caso de los Sephadex G-150, G-75 y G-50 son, respectivamente, de 5.000 a 300.000 daltons, de 3.000 a 80.000 daltons y de 1.500 a 30.000 daltons.

Los geles se prepararon y activaron según las normas de la casa suministradora ("Pharmacia Fine Chemicals"). Los geles hidratados se conservaron en refrigeración hasta su utilización.

III. 2. 10. 1. 3. - Condiciones de trabajo.

El sobrenadante, libre de células y liofilizado, de cultivos de *L. sake* 449 se resuspendió en tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 y urea 1M, mientras que, como tampón de elución, se empleó tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 y urea 0,1 M. La cromatografía se realizó en una cámara termostatada a 0-4 °C y el eluato cromatografiado se recogió en un

colector de fracciones.

El sobrenadante concentrado de *L. sake* 449 se resuspendió en tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 1 M, hasta una concentración 20 veces mayor que la inicial y 20 ml de esta solución se depositaron en una columna (3,2 x 40 cm) de Sephadex G-150, previamente equilibrada con tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 y urea 0,1 M. El eluato, en fracciones de 5 ml, se sometió a una lectura espectrofotométrica a 280 nm para determinar su contenido proteico, mientras que su actividad inhibidora se evaluó de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2. utilizando *L. fermentum* CECT285 como microorganismo indicador. Las fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana se juntaron, liofilizaron y resuspendieron en el tampón de elución para depositarlas de nuevo en una columna (2,5 x 90 cm) de Sephadex G-75, previamente equilibrada con el tampón de elución. Las fracciones eluidas dotadas de actividad antimicrobiana se manipularon como se ha descrito antes y se depositaron de nuevo en una tercera columna (1,6 x 90 cm) de Sephadex G-50. Las fracciones cromatográficas con actividad antimicrobiana se juntaron, liofilizaron y se mantuvieron en un desecador a 4 °C hasta su utilización posterior.

III. 2. 10. 2. - Determinación de la proteína.

Se realizó por la técnica de Lowry, según la modificación de Markwell y col. (1978). La técnica se basa en el desarrollo de color al poner en contacto las proteínas con los reactivos que posteriormente se detallan. El desarrollo del color se debe a una combinación de reacciones:

a.) Formación de un complejo entre los enlaces peptídicos de las

proteínas con el cobre en un medio alcalino (reacción tipo Biuret).

b.) Reducción del reactivo fosfomolibdico-fosfotungstico por la tirosina y el triptófano.

Esta técnica pone de manifiesto los grupos fenoles presentes en las proteínas; por ello es necesario extrapolar los resultados a una curva patrón construida con anterioridad. Como proteína estándar para construir la curva patrón se empleó la seroalbúmina bovina fracción V (figura 3. 5).

La técnica es como sigue:

- Solución A: Na_2CO_3 al 2 %, NaOH al 0,4 % y tartrato sódico potásico ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) al 0,16 % en agua destilada.
- Solución B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 4 % en agua destilada.
- Solución C. Se obtiene mezclando 100 volúmenes de la solución A con 1 volumen de la solución B.
- Solución D: Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada en una proporción 1:1 (v/v).

Procedimiento

A 1 ml de una muestra que contenga entre 10 y 100 μg de proteína se le añaden 3 ml de la solución C; la mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se adicionan 0,3 ml de la solución D, agitándola inmediatamente y dejándola reaccionar durante 45 minutos, al término de los cuales se mide el incremento de la absorbancia a 660 nm con referencia a un blanco preparado de la misma manera pero con

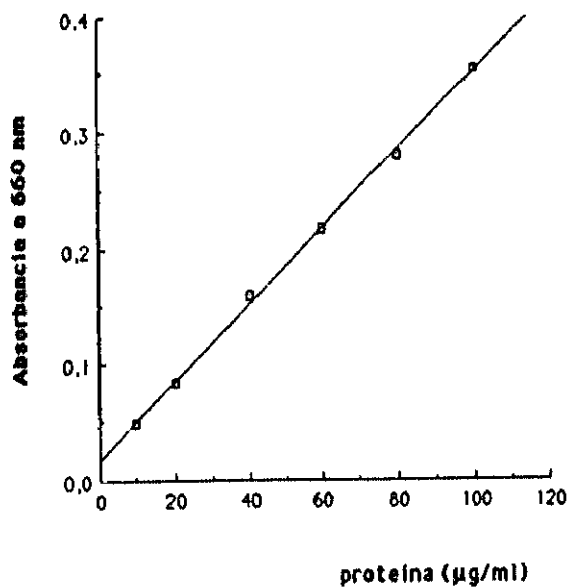


Figura 3. 5. - Recta patrón para la determinación de proteína por el método de Lowry modificado.

agua destilada.

III. 2. 10. 3. Determinación del peso molecular de la sustancia inhibidora por cromatografía de filtración en Sephadex G-50.

La cromatografía de filtración en Sephadex G-50 para determinar el peso molecular de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada por las tres columnas de Sephadex G-150, G-75 y G-50 se realizó de la manera descrita en la sección III. 2. 10. 1. 3. Para ello 20 mg de la sustancia parcialmente purificada, disuelta en 3 ml de tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6, y urea 1 M se depositaron en la columna (1,6 x 90 cm) que contenía el Sephadex G-50, determinándose posteriormente la absorbancia a 280 nm y la actividad antimicrobiana de las fracciones eluidas resultantes.

A continuación, en la misma columna se depositaron 3 ml de una solución que constaba de tampón, como solvente, y como fase disuelta de 5 mg de dextrano azul, 6 mg de α -quimotripsinógeno A (25.000 daltons), 8 mg de Papaná pancreática bovina (13.700 daltons) y 1 mg de vitamina B₁₂ (1.300 daltons). La absorbancia de las fracciones eluidas se determinó a 280 nm. El peso molecular de la sustancia problema se determinó por interpolación en una gráfica (figura 3. 6) en la que se representaba el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas estándar en función de la fracción cromatográfica en la que se encontraban.

III. 2. 11. - Electróforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).

Esta técnica permite separar mezclas complejas de polipéptidos en

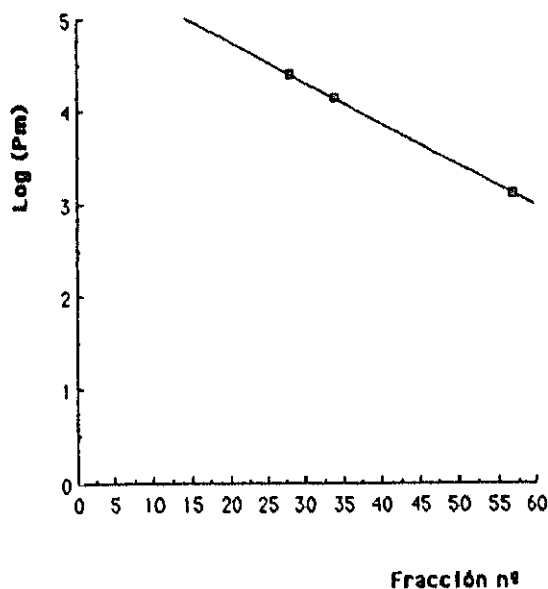


Figura 3. 6. - Recta patrón para la determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-50.
A: α -quimotripsinógeno A, B: RNasa pancreática bovina y C: vitamina B₁₂.

función de su tamaño molecular. La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se realizó según las técnicas de Swank y Munkres (1971) y de Laemmli (1970). El dodecil sulfato sódico es un detergente que con otros agentes, como el mercaptoetanol y el calor, interviene en la desnaturalización de las proteínas a subunidades y además proporciona a las cadenas polipeptídicas una densidad de carga similar. De esta forma cuando el complejo SDS-proteína se somete a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración viene determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipeptido según el principio de exclusión molecular. El campo eléctrico, en este caso, sólo suministra la fuerza impulsora.

III 2. 11. 1. - Técnica de Swank y Munkres (1971).

III 2. 11. 1. 1. - Tampones, geles y soluciones empleadas.

1) Tampón para solubilizar las muestras.

Contiene:

Urea	4,8 g
β -mercaptoetanol	0,5 ml
SDS	0,25 g
Ácido ortofosfórico 0,01 M	hasta 10 ml

2) Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS, pH 6,8.

Contiene:

Ácido ortofosfórico (85 %)	33,7 ml
SDS	5 g
Agua destilada	hasta 500 ml

El pH se ajusta a 6,8 con Tris.

3.) Solución de acrilamida-bisacrilamida.

Contiene:

Acrilamida	18,75 g
N,N'-metilén-Bisacrilamida	1,87 g
Agua destilada	hasta 50 ml

4.) Gel de separación.

Contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	9,99 ml
Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS	3 ml
Urea	14,4 g
Agua destilada	29 ml
TEMED (N,N,N',N', tetrametilén-etilen-diamina)	9 µl
Persulfato amónico (6 %)	0,3 ml

5.) Gel de concentración.

Contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	1,65 ml
Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS	0,5 ml
Urea	2,45 g
Agua destilada	10 ml
TEMED	1,5 µl
Persulfato amónico (6 %)	0,1 ml

6.) Tampón de electroforesis.

Contiene:

Tampón de ácido fosfórico 1 M-SDS	0,225 ml
-----------------------------------	----------

Agua destilada

2,225 ml

7.) Solución de fijación.

Contiene isopropanol: ácido acético: agua destilada (2,5:10:6,5 v/v).

8.) Solución de tinción.

Consiste en una solución de azul brillante de Coomassie al 2 % en ácido acético al 7 %.

9.) Solución de lavado.

Es una solución al 7 % de ácido acético en agua destilada.

III. 2. 11. 1. 2. - Preparación de las muestras.

Las muestras solubilizadas en tampón de solubilización, con 50, 100 y 200 µg de la sustancia antimicrobiana, parcialmente purificada, se mantuvieron durante 5 minutos en baño de agua hirviendo antes de depositar 30 µl de cada solución en el gel de concentración.

III. 2. 11. 1. 3. - Preparación de los geles.

Los geles se prepararon de la manera descrita por Swank y Munkres (1971). El gel consta de dos porciones: fase inferior (gel de separación) y fase superior (gel de concentración). Los geles se prepararon como se describe en las secciones III. 2. 11. 1. 4 y III. 2. 11. 1. 5. Para evitar la presencia de burbujas de aire en los geles la mezcla se degasificó por sonicación en un baño, durante 5 minutos, antes de añadirle el TEMED y el persulfato amónico. Los receptáculos de formación los geles primero se llenaron con los

componentes del gel de separación hasta unos 3 cm de su extremo superior; en la superficie de la mezcla, para que no se formaran meniscos se depositó un pequeño volumen de una solución saturada de butanol. La mezcla se mantuvo durante 1 h a 37 °C y una vez polimerizada, se retiró el butanol y se lavó abundantemente con agua destilada. A continuación se depositó el gel de concentración y se introdujo el peine que forma los pocillos donde se depositarán las muestras. La última solución se polimeriza durante 30 minutos a 37 °C, quedando el gel listo para realizar la electroforesis.

III. 2. 11. 1. 4 - Electroforesis

La electroforesis se realizó pasando por el gel una corriente de 18-20 mA y evitando las temperaturas inferiores a 16 °C para minimizar el riesgo de precipitación de la urea. Finalizada la electroforesis, el gel se extrajo de los cristales del soporte.

III. 2. 11. 1. 5 - Tinción de los geles

Terminada la electroforesis, los geles se introdujeron en una cubeta con la solución de fijación y se mantuvieron fijándose durante, aproximadamente, 8 h, cambiando la solución de fijación 2 ó 3 veces. A continuación se introdujeron en otra cubeta con la solución de tinción donde se mantuvieron durante 2 h a temperatura ambiente. La eliminación del colorante no fijado se realizó con la solución de lavado.

III. 2. 11. 1. 6 - Determinación del peso molecular

El peso molecular de la sustancia inhibidora parcialmente purificada se

determinó por interpolación en una gráfica en la que se representa el logaritmo del peso molecular de las proteínas estándar frente a su distancia de migración en el gel (figura 3. 7). Las proteínas utilizadas en la confección de la recta patrón procedían de dos "kits" comerciales. El primero contenía las proteínas estándar de bajo peso molecular: mioglobina III (2,5 KD), mioglobina II (6,2 KD), mioglobina I (8,1 KD), mioglobina I y II (14 KD) y mioglobina (16,9 KD) y el segundo contenía las proteínas de alto peso molecular: α -lactalbumina (14,2 KD), proteína inhibidora de la tripsina (20,1 KD), tripsinógeno (24 KD), anhidrasa carbónica (29 KD), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (36 KD), ovoalbúmina (45 KD) y seroalbúmina bovina (66 KD).

III. 2. 11. 2. - Técnica de Laemmli (1970)

III. 2. 11. 2. 1. - Tampones, geles y soluciones empleadas

1.) Tampón para solubilizar las muestras.

Contiene:

Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	1,0 ml
Glicerol	0,8 ml
SDS (10 %)	1,6 ml
β -mercaptoetanol	0,4 ml
Azul de bromofenol (0,05 %)	0,2 ml
Agua destilada	4,0 ml

2.) Solución de acrilamida-bisacrilamida.

Contiene:

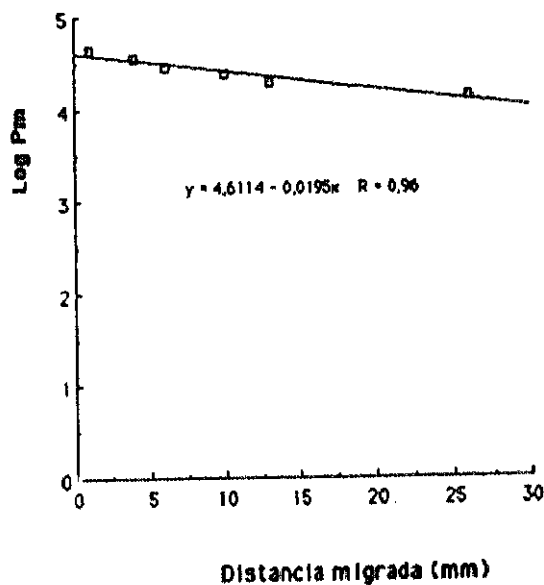


Figura 3. 7. - Recta patrón para la determinación del peso molecular por la técnica de Swank y Munkres.

Acrilamida	14,6 g
N,N-metilén-Bisacrilamida	0,4 g
Agua destilada	hasta 50 ml

3.) Gel de separación.

Contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	20 ml
Tris HCl 1,5 M, pH 8,8	7,5 ml
Agua destilada	1,9 ml
SDS (10 %)	0,3 ml
Persulfato amónico (10 %)	0,15 ml
TEMED	15 μ l

4.) Gel de concentración.

Contiene:

Solución de acrilamida-bisacrilamida	1,3 ml
Tris HCl 0,5 M, pH 6,8	2,5 ml
Agua destilada	6,1 ml
SDS (10 %)	0,1 ml
Persulfato amónico (10 %)	50 μ l
TEMED	10 μ l

5.) Tampon de electroforesis

Contiene:

Tris base	6,6 g
Glicina	28,8 g
SDS	2 g
Agua destilada	2,2 l

6.) Solución de fijación.

Contiene etanol:ácido acético:agua destilada (10:5:85 v/v)

III. 2. 11. 2. 2. - Preparación de las muestras.

Las muestras solubilizadas en el tampón de solubilización con 5, 10 y 15 µg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada se mantuvieron durante 5 minutos en un baño de agua hirviendo, antes de depositar 10 µl de cada solución en el gel de concentración.

III. 2. 11. 2. 3. - Preparación de los geles y electroforesis.

Tanto la preparación de los geles como la electroforesis correspondiente se realizó, esencialmente de la manera descrita en las secciones III. 2. 11. 1. 3. y III. 2. 11. 1. 4.

III. 2. 11. 2. 4. - Tinción de los geles.

Los geles se tiñeron con el reactivo de plata distribuido comercialmente por la casa Bio-Rad. Este reactivo, elaborado según el método de Merrill (1981), es unas 10-50 veces más sensible que el azul brillante de Coomassie para visualizar las proteínas en los geles de poliacrilamida con SDS. La tinción se realizó siguiendo estrictamente las instrucciones recomendadas por la casa suministradora.

III. 2. 11. 2. 5. - Determinación del peso molecular.

El peso molecular de la sustancia inhibidora parcialmente purificada se

determinó interpolando en una gráfica los pesos moleculares de las proteínas estándar frente a la distancia recorrida en su migración en el gel. Las proteínas estándar utilizadas en la confección de la recta patrón procedían de un "kit" comercial que contenía las proteínas de alto peso molecular descritas en la sección III. 2. 11. 1. 6.

III. 2. 12 - Concentración inhibidora mínima de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada en diversos microorganismos indicadores.

Para determinar la concentración inhibidora mínima (CIM), una solución de 8 mg de la proteína purificada por ml de tampón fosfato 4 mM, pH 7,0 se diluyeron sucesivamente 2, 4, 8 y 16 veces. De cada dilución (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) se tomaron alícuotas de 30 µl cuya actividad antimicrobiana se evaluó según la técnica descrita en la sección III. 2. 3. 3. 2. Los microorganismos indicadores empleados fueron *L. fermentum* CECT285, *C. divergens* LV13, *List. monocytogenes* 7973, L15 sv 1/2 y Scott A, *S. aureus* FRI 137, FRI 349 y FRI 362, *C. botulinum* 551 y *C. perfringens* 376.

La concentración inhibidora mínima se define como la concentración mínima de proteína que produce un halo de inhibición en el medio sólido de crecimiento en el que se desarrolla el microorganismo indicador empleado. En este ensayo, únicamente se consideraran como halos de inhibición aquellos cuya corona tenía un radio de la corona mayor de 1 mm.

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV. 1 - Aislamiento y selección de bacterias lácticas

Los homogenizados de las muestras de embutidos crudos curados se sembraron en placas que contenían medio PCA o MRS y se incubaron durante 3 días a 32 °C. Los recuentos obtenidos, tanto de microorganismos totales como de bacterias lácticas, se resumen en la tabla IV. 1. De ellos se deduce que prácticamente la totalidad de la flora bacteriana de los embutidos analizados se encuentra constituida por bacterias lácticas. De las placas de MRS se seleccionaron al azar 50 colonias que se conservaron en congelación hasta su empleo en posteriores estudios.

IV. 2 - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas

IV. 2. 1 - Actividad inhibidora directa

La actividad inhibidora directa de las bacterias lácticas seleccionadas, en diversos microorganismos indicadores, se evaluó de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 2. 1. Los resultados de las pruebas directas de antagonismo se reflejan en las figuras 4. 1 a 4. 20. De la observación de estas figuras se deduce que:

1.) Las 50 bacterias lácticas seleccionadas manifiestan una acción inhibidora variable y cuantificable frente a diversos microorganismos indicadores.

2.) La actividad antimicrobiana es mayor cuando las cepas se desarrollan

Tabla IV. 1. - Recuentos bacterianos de las placas con PCA ó MRS, conteniendo homogenizados de los embutidos crudos curados^a.

	Medios de cultivo	
	PCA	MRS
<u>Muestra 1:</u>		
Microorganismos totales	$1,9 \times 10^7$	-
Bacterias lácticas	-	$2,0 \times 10^7$
<u>Muestra 2:</u>		
Microorganismos totales	$2,0 \times 10^7$	-
Bacterias lácticas	-	$2,1 \times 10^7$

^a Recuentos expresados en ufc/ml.

antes de depositar el microorganismo indicador, durante 24 h a 32 °C en las placas de MRS

Con los resultados de estas experiencias, se seleccionaron las 8 cepas que mostraron una mayor actividad inhibidora en el mayor número de microorganismos indicadores, para realizar con ellas futuras experiencias. Las cepas seleccionadas fueron las números 2, 3, 8, 11, 20, 23, 29 y 38. A estas cepas se unió, posteriormente la 449, seleccionada por su actividad inhibidora de entre otras 750 bacterias lácticas aisladas en nuestro Departamento con posterioridad a las 50 iniciales.

IV. 2. 2. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células.

Los sobrenadantes concentrados libres de células se obtuvieron a partir de las cepas seleccionadas de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 3. 1. La actividad inhibidora de los sobrenadantes se evaluó frente a los microorganismos indicadores *L. fermentum* CECT285 y *L. curvatus* Lb 726 y frente a varias cepas de *List. monocytogenes* y *S. aureus*. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. 2.; destaca el que únicamente el sobrenadante concentrado de la cepa 449 muestre actividad inhibidora exocelular en los diversos microorganismos indicadores empleados.

IV. 2. 3. - Actividad inhibidora de los extractos de los medios sólidos en los que se desarrollaron las bacterias lácticas seleccionadas.

Preparados los extractos de los medios sólidos en los que se

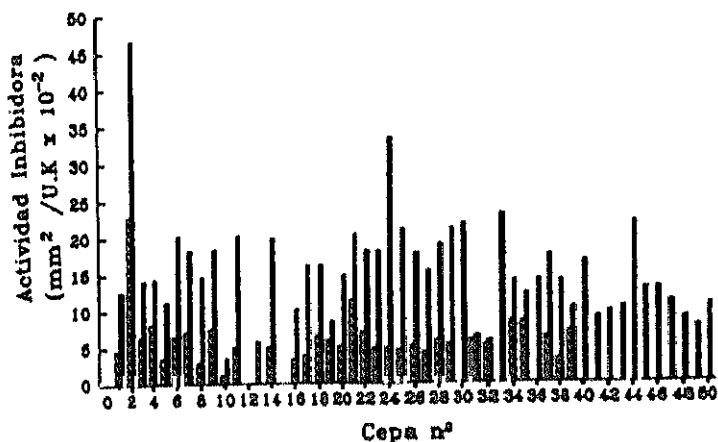


Figura 4.1. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* 285.

■ Actividad inhibidora directa; ■ Actividad inhibidora diferida

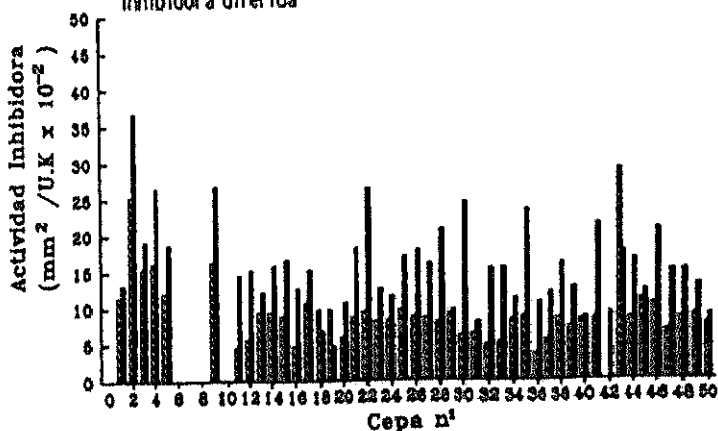


Figura 4.2. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. casei*/475. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

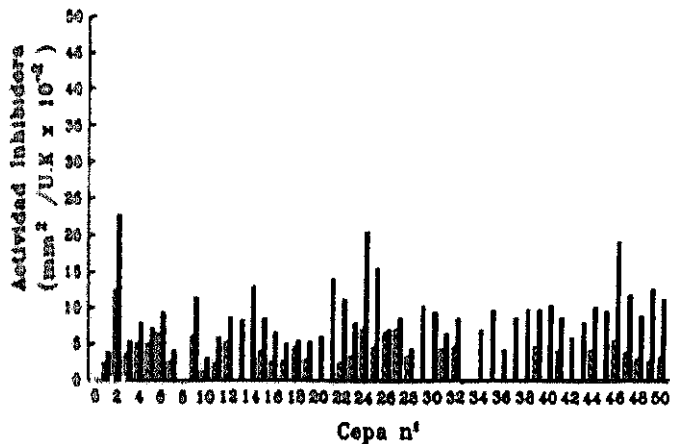


Figura 4.3 - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas frente a *L. acidophilus* 289. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

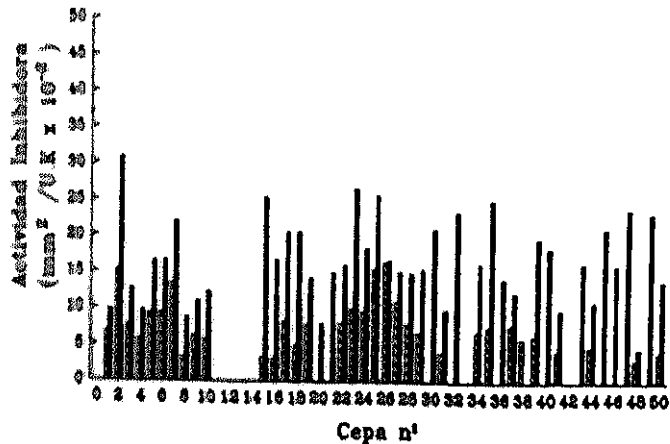


Figura 4.4 - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. mesentericus* 394. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.

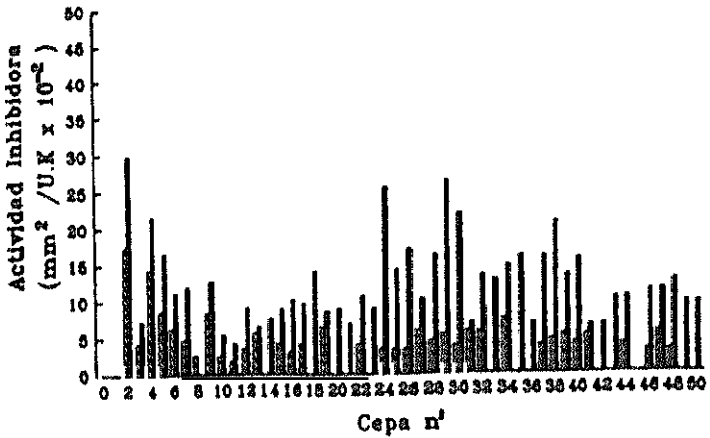


Figura 4.5. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. plantarum* 221. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

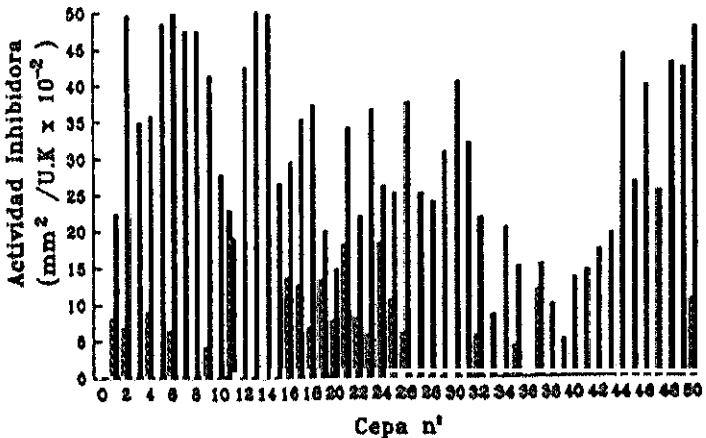


Figura 4.6. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *C. piscicola* MR371. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

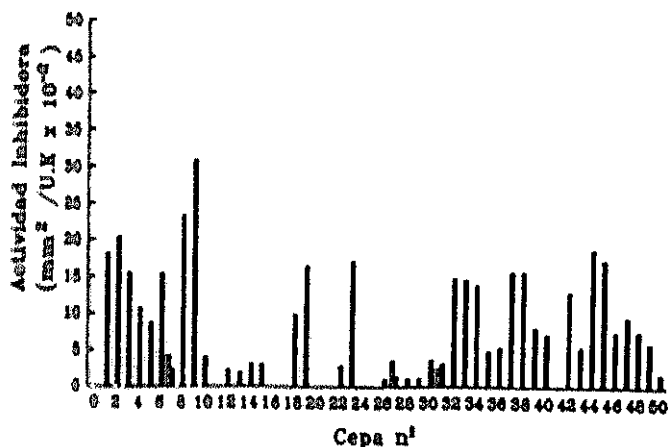


Figura 4.7.- Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *E. faecalis* 481. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

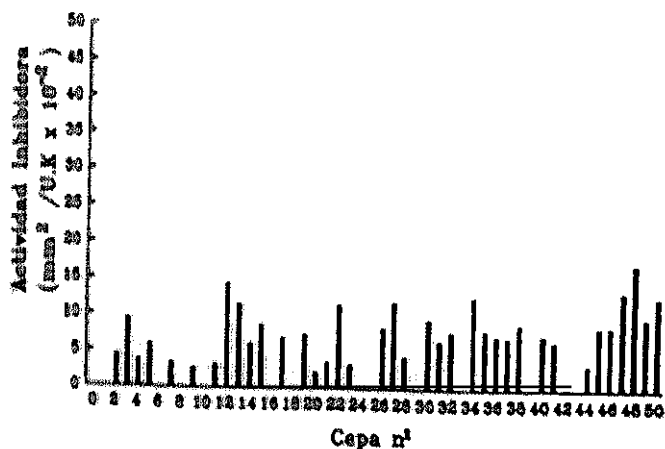


Figura 4.8.- Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *E. faecium* 410. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

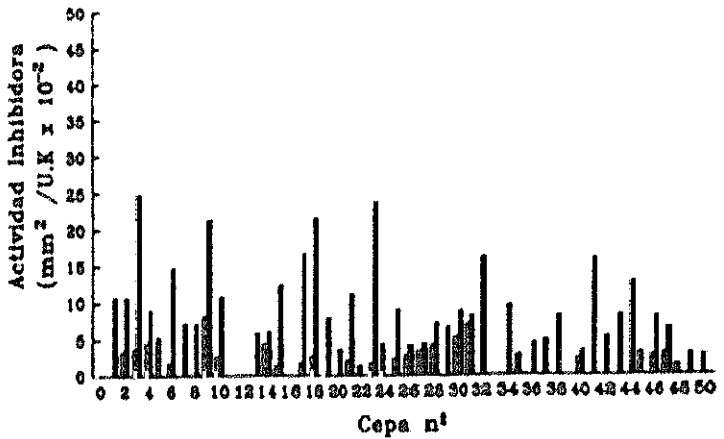


Figura 4.9. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *M. varians* 230. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

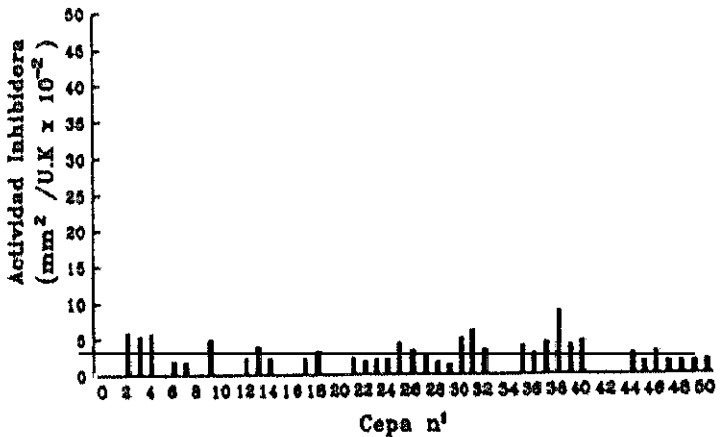


Figura 4.10. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. xylosus* 237. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

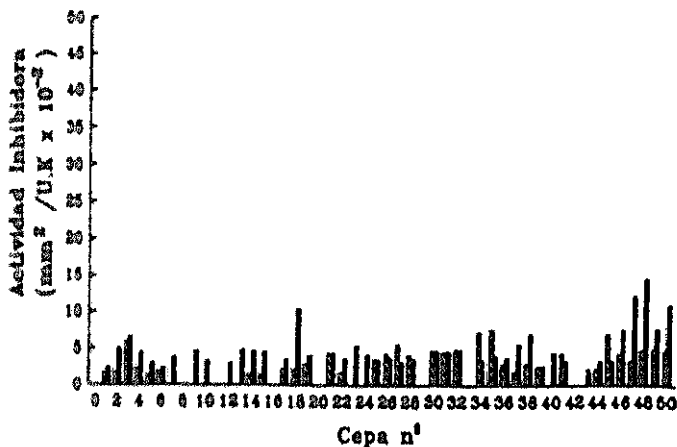


Figura 4.11. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. aureus* 59. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 1.

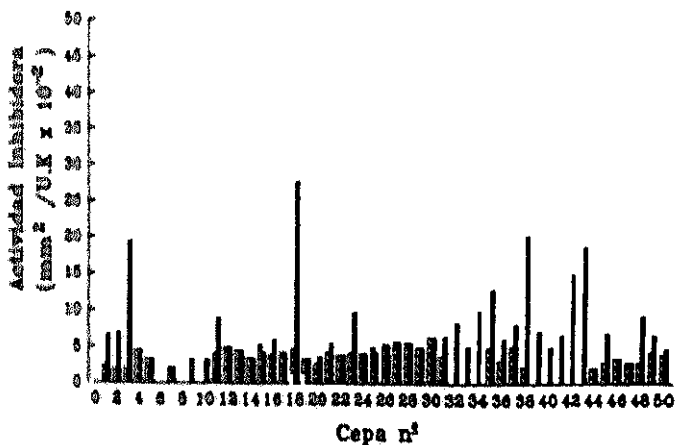


Figura 4.12. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Br. thermosphacta* 10018. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4. 1.

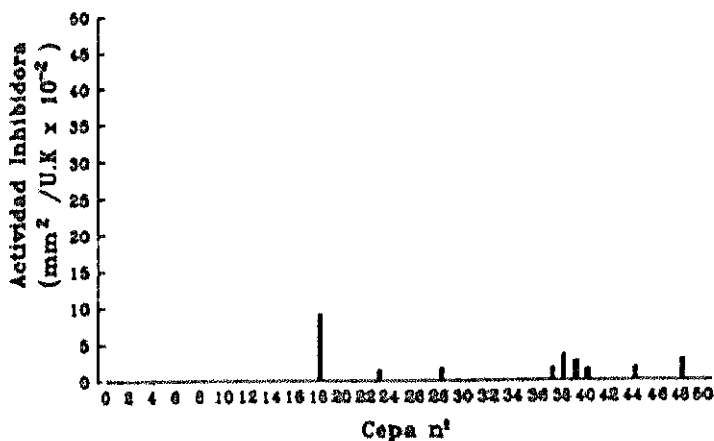


Figura 4.13. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *B. cereus* 148. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

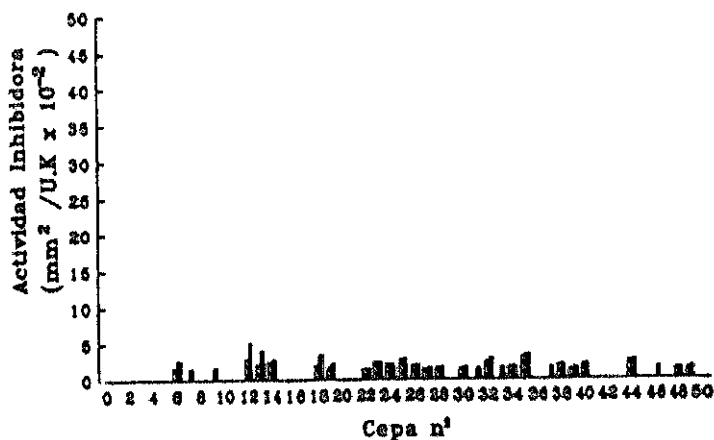


Figura 4.14. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *B. stearothermophilus* 49. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

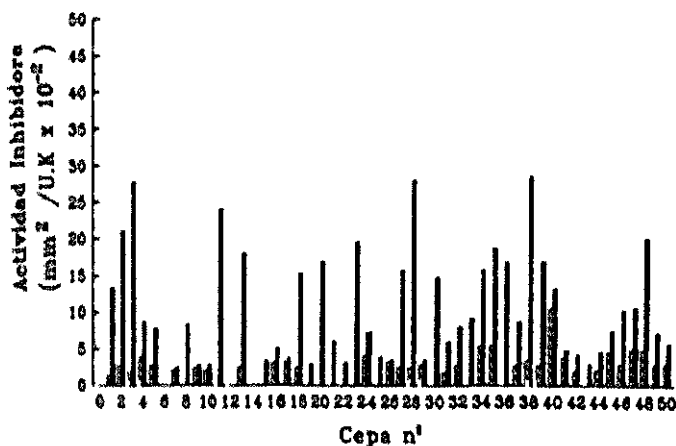


Figura 4.15. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *E. coli* BW545. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

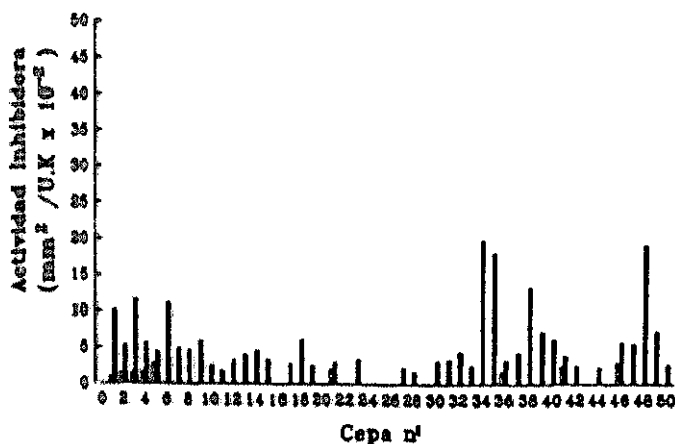


Figura 4.16. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Ent. cloacae* 194. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

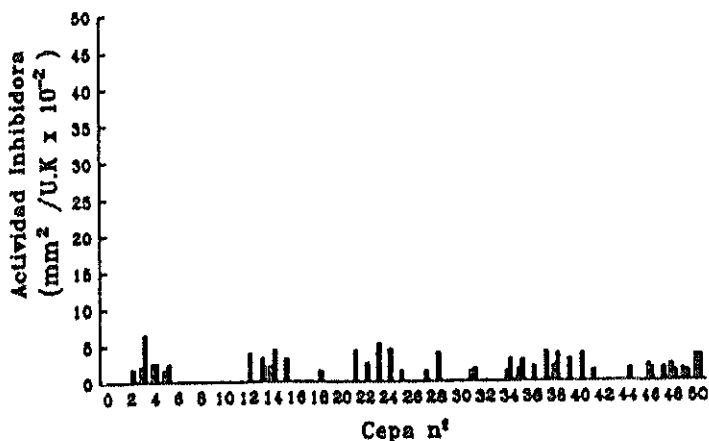


Figura 4.17. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Sh. flexneri* 585. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

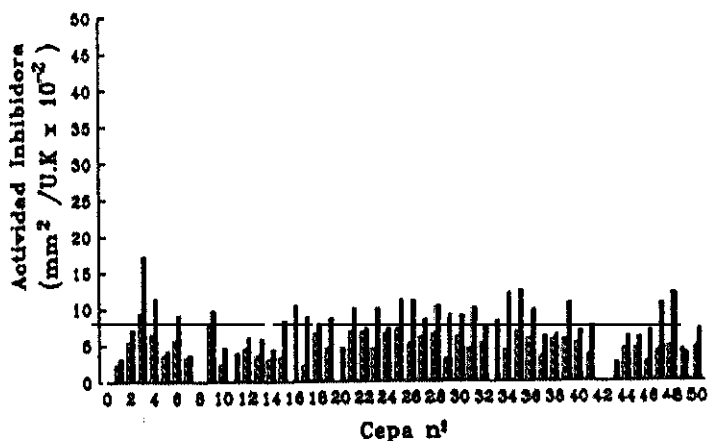


Figura 4.18. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *S. typhimurium* 443. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

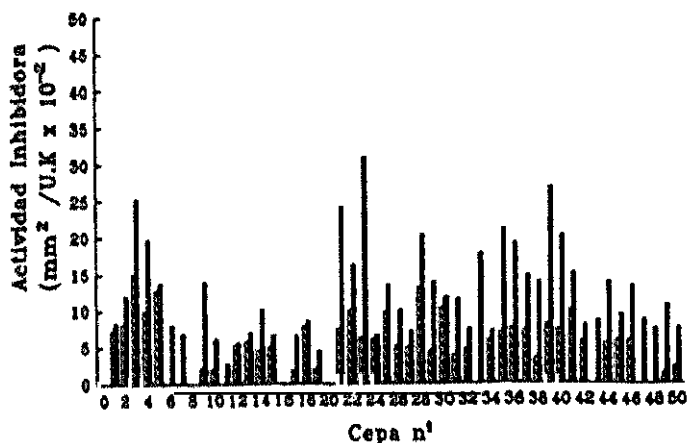


Figura 4.19. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Y. enterocolitica* E20. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

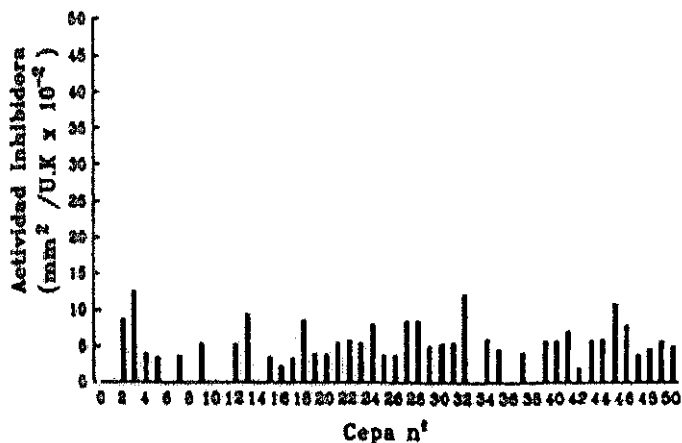


Figura 4.20. - Actividad inhibidora de las 50 bacterias lácticas seleccionadas frente a *Ps. fluorescens* DC7. Las columnas poseen el mismo significado que en la figura 4.1.

Tabla IV. 2. - Actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados libres de células de las bacterias lácticas seleccionadas frente a diversos microorganismos indicadores^a.

Microorganismo indicador												
Cepa												
Nº	Lf	Lc	Cd	Lm	L11	L12	L13	L14	Sa1	Sa2	Sa3	
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
449	69.2	47.1	57.6	57.6	28.8	58.7	79.1	57.6	37.5	8.6	17.6	

a: Actividad inhibidora en mm²/ml/U. Klett. Lf: *L. fermentum* CECT285; Lc: *L. curvatus* Lb726; Cd: *Carnobacterium divergens* LV13; Lm: *L. mesenteroides* MR364; L11: *List. monocytogenes* NCTC5105; L12: *List. monocytogenes* L15 sv 1/2; L13: *List. monocytogenes* NCTC5105; L14: *List. monocytogenes* Scott A; Sa1: *S. aureus* FRI 137; Sa2: *S. aureus* FRI 361; Sa3: *S. aureus* FRI 349

desarrollaron las 8 cepas seleccionadas, se evaluó su actividad antimicrobiana frente a *L. fermentum* CECT285, por ser éste un microorganismo especialmente sensible a la acción inhibidora de las bacterias lácticas. Los resultados obtenidos demostraron la ausencia de actividad inhibidora en los medios sólidos, lo que confirma, junto a los resultados obtenidos con los sobrenadantes concentrados libres de células, la ausencia de una sustancia inhibidora exocelular en las 8 cepas analizadas.

IV. 2. 4. - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas.

La experiencia se realizó de la manera descrita en la sección III. 2. 3. 5., mientras que en la Tabla IV. 3. se muestran los resultados obtenidos, de los que se infiere que:

1) La actividad inhibidora de la cepa 2, tanto en *L. fermentum* CECT285 como en otros microorganismos indicadores, puede atribuirse, en su mayor parte, a la producción de peróxido de hidrógeno, ya que la adición de catalasa al medio de cultivo disminuye significativamente su actividad inhibidora.

2) La actividad antimicrobiana del resto de las cepas analizadas no es atribuible a la producción de peróxido de hidrógeno puesto que la catalasa no modifica mucho su actividad inhibidora.

IV. 2. 5. - Determinación del peróxido de hidrógeno de los medios de cultivo

Tabla IV. 3 - Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas frente a *L. fermentum* CECT285.

Cepa nº	Área de inhibición (mm ²) ^a		Reducción actividad inhibidora (%)
	Sin catalasa	Con catalasa ^b	
2	112,1	11,7	89,6
3	20,6	19,7	4,4
8	12,1	11,0	9,1
11	8,7	7,8	10,3
20	16,0	14,8	7,5
23	26,6	26,1	1,9
29	8,7	7,9	9,2
38	21,7	20,6	5,1

a: Área de la corona circular.

b: Concentración final de 4000 UI/ml de medio.

Para determinar el peróxido de hidrógeno de los medios de cultivo en el que se desarrollaron las cepas seleccionadas se utilizó la técnica descrita en la sección III 2.3.6. No obstante, como se aprecia en la figura 4.21., la concentración de peróxido de hidrógeno en el medio MRS disminuye a medida que aumenta el periodo de la toma de muestras. Sin embargo, la concentración de peróxido de hidrógeno se mantiene constante en el tampón de fosfato-glucosa, pH 7.0 independientemente del tiempo de la toma de muestras.

Con los resultados de las experiencias descritas se decidió que lo más adecuado sería evaluar el peróxido de hidrógeno producido cuando las cepas seleccionadas se desarrollasen en el tampón previamente citado. Sin embargo, la producción de peróxido de hidrógeno fue negativa en las cepas seleccionadas, lo que significa que los microorganismos utilizados no producen dicho metabolito en el tampón utilizado o que la técnica empleada no es suficientemente sensible para detectarlo.

IV.3 - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas seleccionadas.

Las 7 cepas con la mayor actividad inhibidora directa o exocelular frente a diversos microorganismos indicadores se sometieron a varias pruebas de identificación y caracterización bioquímica parcial. Las cepas seleccionadas fueron las números 2, 11, 20, 23, 29, 38 y 449.

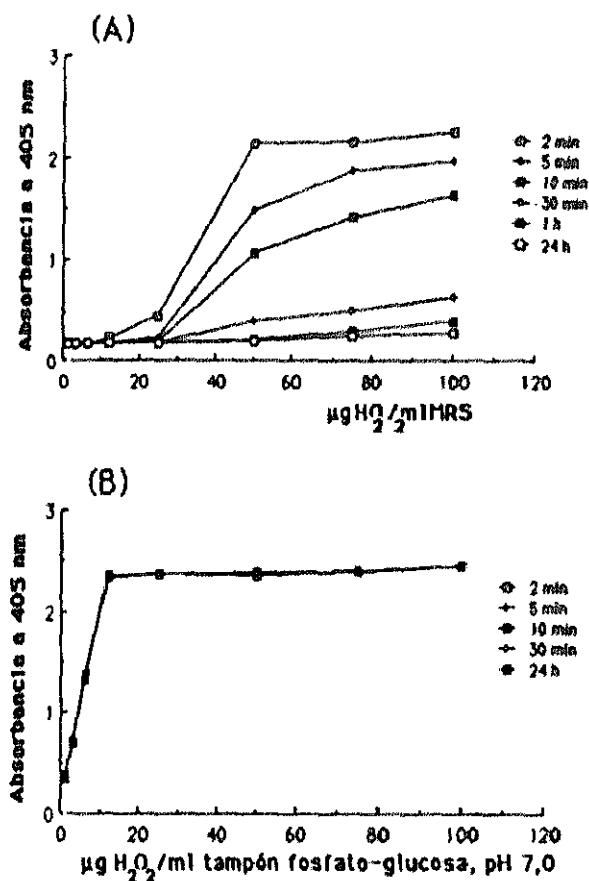


Figura 4. 21. - Fluctuación de la concentración de peróxido de hidrógeno en medio MRS (A) y en tampón de fosfato-glucosa, de pH 7,0 (B), con respecto al tiempo de la toma de muestras.

IV. 3. 1. - Morfología y tinción por el método de Gram

La observación microscópica de las preparaciones teñidas con el método de Gram evidenció la existencia en todas ellas de bacilos cortos Gram-positivos (Tabla IV. 4).

IV. 3. 2. - Prueba de la catalasa

Todas las cepas analizadas resultaron catalasa negativas (Tabla IV. 4).

IV. 3. 3. - Producción de CO_2

La capacidad de producir CO_2 de las cepas analizadas, se evaluó de la manera descrita en la sección III. 2. 4. 3. Ninguna de las cepas seleccionadas producía el citado gas (Tabla IV. 4).

IV. 3. 4. - Hidrólisis de la arginina

Los resultados de la prueba de hidrólisis de la arginina se muestran en la tabla IV. 4.; como puede observarse no reaccionan uniformemente todas las cepas seleccionadas. Dicha reacción varía desde la no modificación del color del medio hasta la adquisición de una tonalidad marrón oscura.

IV. 3. 5. - Producción de ácido sulfhídrico

La producción de SH_2 por las cepas seleccionadas se investigó utilizando

diversas técnicas (sección III. 2. 4. 5). No obstante, en ningún caso se observó ennegrecimiento del medio de cultivo, por lo que las cepas analizadas se consideran ácido sulfhídrico negativas

IV. 3. 6. - Prueba de Voges-Proskauer

La capacidad de las cepas seleccionadas de producir acetoina se evaluó mediante la prueba de Voges-Proskauer (sección III. 2. 4. 6). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV. 4.; de ellos se deduce que la producción de acetoina por las cepas analizadas varía de unas a otras.

IV. 3. 7. - Fermentación de carbohidratos

La capacidad de las cepas seleccionadas de fermentar diversos carbohidratos se evaluó siguiendo el procedimiento descrito en la sección III. 2. 4. 8. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. 5. De ellos se deduce que:

1.) Todas las cepas analizadas fermentan los azúcares ribosa, galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, N-acetil glucosamina, sacarosa y trehalosa.

2.) La fermentación de los siguientes carbohidratos: L-arabinosa, D-xilosa, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa y melibiosa, varía en función de la cepa analizada. Así, mientras todas las cepas fermentan la esculina y la melibiosa excepto la 38 y 449, la D-xilosa únicamente es fermentada por la cepa 449.

3.) Hay algunos carbohidratos que no son fermentados por ninguna cepa;

citaremos entre ellos los siguientes: eritritol, D-arabinosa, L-xilosa, adenitol, β -metil D-xilósido, sorbosa, ramnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α -metil D-mandósido, α -metil D-glucósido, inulina, melecitosa, rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, β -gentibiosa, D-turanosa, D-xilosa, D-tagatosa, D-fucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-cetogluconato y 5-cetogluconato.

La fermentación de los azúcares manitol, ribosa, melibiosa, maltosa, sacarosa y trehalosa es de gran importancia en la clasificación de los lactobacilos de origen cárnico. Siguiendo el esquema de identificación propuesto por Schillinger y Lücke (1987), las 7 bacterias lácticas analizadas se clasificaron tentativamente como *Lactobacillus sake*.

IV. 3. 8 - Tolerancia al NaCl

La tolerancia de las cepas seleccionadas al NaCl se evaluó en caldo MRS suplementado en un caso con un 7 % de NaCl y en otro con 10 % de la misma sal. El medio, una vez inoculado, se incubó durante un tiempo máximo de 6 días a 32 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. 4. Todas las cepas crecen a una concentración de NaCl del 7 %, sin embargo, cuando la concentración es del 10 % el desarrollo de los microorganismos es, en general, muy débil, excepto en la cepa 449 que crece bien. La cepa 29 no crece a dicha concentración de NaCl.

Tabla IV. 4. - Características morfológicas y bioquímicas de las bacterias lácticas seleccionadas.

Característica	Cepa Nº						
	2	11	20	23	29	38	449
Morfología	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo
Tinción Gram	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	-	-	-	-	-	-	-
Producción CO ₂	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis Arg	+	+	-	-	+	+	-
Producción SH ₂	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	-	-	+	+	-
<u>Crecimiento en:</u>							
7 % NaCl	+	+	+	+	+	+	+
10 % NaCl	d	d	d	d	-	d	+
pH 3,9	-	-	-	-	-	-	d

d= Crecimiento débil.

Tabla IV 5 - Utilización de carbohidratos por las bacterias seleccionadas.

Carbohidrato	Cepa N°						
	2	11	20	23	29	38	449
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	+	+	+	-	+	+	+
Ribosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Xilosa	-	-	-	-	-	-	+
L-Xilosa	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
β -Man II D-Xilosido	-	-	-	-	-	-	-
Galaetosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructosa	+	+	+	+	+	+	+
D-Manosa	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Ramnosol	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
α -Man II D-Manosido	-	-	-	-	-	-	-

Tabla IV. 5. - (continuación)

Carbohidrato	Cepa Nº						
	2	11	20	23	29	38	449
α -Metil D-Glucósido	-	-	-	-	-	-	-
N-acetilglucosamina	+	+	+	+	+	+	+
Amigdalina	±	±	±	+	+	-	±
Arbutina	±	+	±	±	+	-	±
Esculina	+	+	+	+	+	-	+
Salicina	+	+	+	+	+	±	±
Celobiosa	+	+	+	+	+	-	±
Maltosa	+	+	+	-	+	-	-
Lactosa	+	+	+	+	+	-	-
Melibiosa	+	+	+	+	+	+	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-	-
Melecitosa	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	-	-	-	-	-	-
Glucógeno	-	-	-	-	-	-	-
Xilitol	-	-	-	-	-	-	-
β -Gentibiosa	-	-	-	-	-	-	+
D-Turanosa	-	-	-	-	-	-	-
D-Lixosa	-	-	-	-	-	-	-

Tabla IV. 5. - (continuación)

Carbohidrato	Cepa Nº						
	2	11	20	23	29	38	449
D-Tagatosa	-	-	-	-	-	-	±
D-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucosa	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
Gluconato	-	-	-	-	-	-	-
2-cetoglucon.	-	-	-	-	-	-	-
5-cetoglucon.	-	-	-	-	-	-	-

IV. 3. 9. - Tolerancia al pH de 3,9

Las cepas analizadas no crecen en medio MRS cuyo pH se ajusta a 3,9 con HCl 1 N, a excepción de la cepa 449 que se desarrolló débilmente (Tabla IV. 4).

IV. 4 - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* a diversas temperaturas

Los parámetros cinéticos estudiados durante el desarrollo de las cepas de *L. sake* a 4, 8, 15, 20 y 32 °C fueron: velocidad específica de crecimiento (μ), tiempo de duplicación (td) y número de generaciones por hora (g/h). Dichos parámetros también se calcularon con las cepas de *L. sake* Lb684, *L. curvatus* Lb726 y *L. plantarum* Lb577, para comparar, de esta manera, nuestros resultados con los aislamientos de otros investigadores.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas IV. 6 a IV. 10. De ellos se deduce que los parámetros cinéticos de crecimiento en cada una de las temperaturas estudiadas son bastante similares entre las cepas de *L. sake* aisladas en nuestro Departamento. Sólo *L. sake* 449 no crece a 4 °C; a 8 °C se desarrolla más lentamente que el resto de las cepas, mientras que a 15, 20 y 32 °C lo hace de forma comparable. Las cepas de *L. curvatus* Lb726 y *L. plantarum* Lb577 muestran un desarrollo muy débil a 4 °C, aunque a 15, 20 °C y, especialmente, 32 °C, muestran tasas de crecimiento similares a las de las cepas de *L. sake* aisladas por nosotros.

Tabla IV. 6. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* seleccionadas y de otras bacterias lácticas a 4 °C.

Cepa	Parámetro Cinético de Crecimiento		
	μ (h ⁻¹)	td (h)	g/h
2	0,0050	138,6	0,0072
11	0,0033	210,0	0,0048
20	0,0046	150,6	0,0066
23	0,0037	187,3	0,0053
29	0,0038	182,4	0,0053
38	0,0050	138,6	0,0072
449	-	-	-
(A)	0,0030	231,0	0,0043
(B)	0,0008	911,8	0,0011
(C)	0,0008	911,8	0,0011

(A): *L. sake* Lb584.

(B): *L. curvatus* Lb726.

(C): *L. plantarum* Lb577.

Tabla IV. 7. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* seleccionadas y de otras bacterias lácticas a 8 °C.

Cepa	Parámetro Cinético de Crecimiento		
	μ (h ⁻¹)	td (h)	g/h
2	0,014	49,5	0,020
11	0,017	41,0	0,024
20	0,016	43,9	0,023
23	0,015	46,2	0,021
29	0,013	51,3	0,019
38	0,017	41,5	0,024
449	0,004	150,6	0,007
(A)	0,006	115,5	0,009
(B)	0,001	693,0	0,001
(C)	0,002	277,2	0,004

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 6.

Tabla IV. 8. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* seleccionadas y de otras bacterias lácticas a 15 °C.

Cepa	Parámetros cinéticos de crecimiento		
	μ (h ⁻¹)	td (h)	g/h
2	0,030	23,1	0,043
11	0,031	22,3	0,045
20	0,034	20,4	0,049
23	0,030	23,1	0,043
29	0,036	19,2	0,052
38	0,027	25,7	0,039
449	0,030	23,3	0,043
(A)	0,042	16,5	0,061
(B)	0,017	40,1	0,025
(C)	0,019	37,2	0,027

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 6.

Tabla IV. 9 - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* seleccionadas y de otras bacterias lácticas a 20 °C.

Cepa	Parámetro Cinético de Crecimiento		
	μ (h ⁻¹)	t _d (h)	g/h
2	0,045	15,4	0,065
11	0,051	13,6	0,073
20	0,052	13,3	0,075
23	0,050	13,8	0,072
29	0,054	12,8	0,078
38	0,042	16,5	0,060
449	0,053	13,0	0,077
(A)	0,045	15,4	0,065
(B)	0,039	17,6	0,057
(C)	0,038	18,1	0,055

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 6.

Tabla IV. 10. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* seleccionadas y de otras bacterias lácticas a 32 °C.

Cepa	Parámetro Cinético de Crecimiento		
	μ (h ⁻¹)	td (h)	g/h
2	0,145	4,78	0,21
11	0,135	5,10	0,20
20	0,120	5,80	0,17
23	0,130	5,30	0,19
29	0,110	6,30	0,16
30	0,127	5,40	0,18
4-49	0,119	5,83	0,17
(A)	0,100	6,89	0,14
(B)	0,114	6,05	0,16
(C)	0,107	6,48	0,15

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 6.

IV. 5. - Síntesis y cinética de la producción de metabolitos finales

De cultivos de las cepas de *L. sake* seleccionadas desarrolladas en medio MRS a diversas temperaturas se tomaron alícuotas que no sólo se utilizaron para determinar los parámetros cinéticos descritos en la sección IV. 4, sino, también, para estimar el pH final, la masa celular seca y las concentraciones de ácidos L(+) y D(-) láctico y de diacetilo/acetoina.

IV. 5. 1. - Ácidos L(+) láctico y D(-) láctico

Las determinaciones de los ácidos L(+) y D(-) láctico se realizaron de la forma descrita en la sección III. 2. 6. 1; los resultados obtenidos se muestran en las Tablas IV. 11 a IV. 15. De ellos se deduce que las cepas de *L. sake* seleccionadas sintetizan cantidades detectables de ácido láctico a todas las temperaturas, incluida la de 4 °C. Sin embargo, *L. curvatus* Lb726 y *L. plantarum* Lb577 no producen cantidades cuantificables a 4 °C, y siendo muy pequeña la producida a 8 °C. No obstante, a medida que aumenta la temperatura de incubación, la producción de ácido láctico por *L. curvatus* Lb726 y *L. plantarum* Lb577 es similar a los de las cepas de *L. sake* seleccionadas, mostrando incluso una mayor producción que éstas cuando la temperatura de incubación es de 32 °C.

IV. 5. 2. - Producción de diacetilo/acetoina

La determinación de diacetilo/acetoina se efectuó siguiendo el método de Westerfield (1945), descrito en la sección III. 2. 6 de este trabajo.

IV 11. - pH final, masa celular seca, producción final y producción por masa celular seca de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico por las cepas de *L. sake* seleccionadas y por otras bacterias lácticas a 4 °C.

Cepa	pH	mcs (mg/ml)	Producción final (mg/ml)		Productividad (mg/mg mcs h)	
			L-LA	D-LA	L-LA	D-LA
2	4,85	1,13	7,28	2,64	0,038	0,013
11	5,05	0,96	4,56	Nd	0,028	Nd
20	5,00	1,04	4,48	0,36	0,025	0,002
23	5,00	1,03	6,64	0,24	0,038	0,001
29	5,60	0,91	1,52	Nd	0,010	Nd
38	4,90	1,11	6,88	1,12	0,036	0,006
(A)	4,80	1,05	2,54	0,74	0,011	0,003
(B)	5,80	0,69	Nd	Nd	Nd	Nd
(C)	5,70	0,69	Nd	Nd	Nd	Nd

(A): *L. sake* Lb684; (B): *L. curvatus* Lb726; (C): *L. plantarum* Lb577.

Nd: No detectable; mcs: masa celular seca; L-LA: Ácido L(+) láctico; D-LA: Ácido D(-) láctico.

Tabla IV. 12. - pH final, masa celular seca, producción final y producción por masa celular seca de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico por las cepas de *L. sake* seleccionadas y por otras bacterias lácticas a 8 °C.

Cepa	pH	mcs (mg/ml)	Producción final (mg/ml)		Productividad (mg/mg mcs h)	
			L-LA	D-LA	L-LA	D-LA
2	4,35	1,26	7,63	2,68	0,050	0,017
11	4,45	1,28	8,70	1,20	0,057	0,008
20	4,30	1,30	9,76	2,88	0,063	0,018
23	4,35	1,28	7,92	2,24	0,052	0,015
29	4,80	1,17	4,88	1,20	0,035	0,008
38	4,30	1,28	8,44	2,88	0,055	0,019
449	5,00	0,89	3,29	Nd	0,030	Nd
(A)	4,70	1,12	7,00	1,20	0,052	0,009
(B)	5,80	0,71	0,15	Nd	0,002	Nd
(C)	5,20	0,92	2,70	Nd	0,024	Nd

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 11.

Tabla IV. 13 - pH final, masa celular seca, producción final y producción por masa celular seca de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico por las cepas de *L. sake* seleccionadas y por otras bacterias lácticas a 15 °C.

Cepa	pH	mcs (mg/ml)	Producción final (mg/ml)		Productividad (mg/mg mcs h)	
			L-LA	D-LA	L-LA	D-LA
2	4,25	1,36	9,04	2,88	0,221	0,070
11	4,20	1,38	11,28	1,32	0,272	0,032
20	4,20	1,32	10,00	2,96	0,252	0,075
23	4,30	1,32	8,40	2,72	0,212	0,069
29	4,70	1,21	6,21	1,20	0,171	0,033
38	4,20	1,37	9,44	3,28	0,229	0,080
449	4,40	1,34	7,92	1,02	0,197	0,025
(A)	4,49	1,19	8,30	1,23	0,232	0,034
(B)	4,35	1,06	5,84	0,48	0,183	0,015
(C)	4,75	0,98	10,74	Nd	0,365	Nd

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 11.

Tabla IV. 14. - pH final, masa celular seca, producción final y producción por masa celular seca de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico por las cepas de *L. sake* seleccionadas y por otras bacterias lácticas a 24 °C.

Cepa	pH	mcs (mg/ml)	Producción final (mg/ml)		Productividad (mg/mg mcs h)	
			L-LA	D-LA	L-LA	D-LA
2	4,10	1,43	9,90	3,20	0,43	0,139
11	4,10	1,42	11,34	1,44	0,50	0,063
20	4,10	1,36	11,04	2,80	0,51	0,128
23	4,20	1,38	10,08	2,64	0,46	0,119
29	4,60	1,34	7,84	2,32	0,37	0,108
38	4,10	1,46	10,40	3,64	0,44	0,155
449	4,25	1,46	9,50	1,12	0,41	0,047
(A)	4,30	1,27	10,50	1,72	0,52	0,084
(B)	4,50	1,31	10,40	0,81	0,50	0,038
(C)	4,65	1,30	13,70	Nd	0,66	Nd

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 11.

Tabla IV. 15 - pH final, masa celular seca, producción final y producción por masa celular seca de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico por las cepas de *L. sake* seleccionadas y por otras bacterias lácticas a 32 °C.

Cepa	pH	mcs (mg/ml)	Producción final (mg/ml)		Productividad (mg/mg mcs h)	
			L-LA	D-LA	L-LA	D-LA
2	4,00	1,46	11,68	3,44	0,67	0,196
11	4,05	1,46	11,44	1,52	0,65	0,086
20	4,05	1,36	11,44	2,16	0,70	0,132
23	4,10	1,40	11,36	2,32	0,68	0,138
29	4,15	1,44	10,72	3,28	0,62	0,189
38	3,95	1,53	11,76	2,88	0,64	0,156
449	4,15	1,54	10,01	1,39	0,54	0,075
(A)	4,05	1,31	11,50	1,38	0,73	0,087
(B)	4,05	1,42	13,44	1,22	0,79	0,071
(C)	4,05	1,33	13,52	Nd	0,85	Nd

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 11.

A las temperaturas de incubación empleadas, ninguna de las cepas estudiadas produjo niveles detectables de diacetilo/acetoina en los medios de cultivo utilizados, lo que parece indicar que la producción de estas sustancias por las cepas de *L. sake* y de otros lactobacilos analizados es mínima o nula.

IV. 6. - Identificación y curado de los plásmidos de algunas cepas de *L. sake* dotadas de actividad inhibidora en los sobrenadantes concentrados de sus cultivos líquidos

Experiencias paralelas a las aquí expuestas, realizadas por otros investigadores de nuestro departamento, dieron lugar al aislamiento de otras bacterias lácticas, identificadas también tentativamente como *L. sake*, que poseían actividad antimicrobiana, detectable en los sobrenadantes concentrados de los cultivos libres de células, no atribuible a los ácidos orgánicos, al peróxido de hidrógeno ni a los bacteriófagos. Con el objeto de conocer la posible estabilidad genética de la actividad antimicrobiana de las cepas de interés, así como para determinar si la actividad se encontraba codificada en plásmidos, se iniciaron experiencias de visualización de plásmidos y de curado de los mismos.

IV. 6. 1. - Visualización de los plásmidos

Las cepas analizadas fueron *L. sake* 31, 77, 90, 148, 163, 177 y 180. Los resultados iniciales obtenidos partiendo de 100 ml de cultivo y siguiendo el método de Currier y Nester para el aislamiento del DNA plasmídico (secciones III. 2. 7. 1. 2 y III. 2. 7. 1. 3), indicaron que las cepas de *L. sake* analizadas poseían 1 ó 2 plásmidos de pequeño tamaño molecular que fluctuaba entre

1,60 y 1,95 Kb (no se muestran los resultados). A continuación y partiendo de 400 ml de los cultivos, se intentó no sólo el aislamiento del DNA plasmídico, sino su purificación a homogeneidad centrifugando las muestras en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etidio (CsCl-BrEt) (sección III. 2. 7. 1. 4). Los resultados fueron negativos (no se muestran los resultados), al no detectarse la existencia de bandas definidas en los geles de electroforesis, lo cual puede atribuirse o al gran número de pasos de que consta esta técnica, o a la posible inestabilidad de los plásmidos presentes en las cepas analizadas.

Para disminuir el número de pasos de la técnica de aislamiento y purificación del DNA plasmídico previamente descrita, las muestras no se trataron con RNasa ni con proteasa. Los resultados obtenidos volvieron a ser negativos ya que el DNA plasmídico obtenido de este modo se encuentra tan poco purificado que es prácticamente imposible observar bandas de DNA en los geles de electroforesis.

Sin embargo, empleando la técnica miniaturizada y rápida de aislamiento e identificación de plásmidos (sección III. 2. 7. 1. 5), realizada tomando alícuotas de 10 ml de los cultivos, se observó la existencia de 4 bandas de DNA en las cepas de *L. satre* 31 y 77 (figuras 4. 22 y 4. 23) y de 7 en la 148 (figura 4. 24). Dos de ellas de 1,95 y 2,32 Kb, son comunes a las tres cepas. *L. satre* 31 y 77 poseen, además, una banda de DNA de 8 Kb y otra de 23 Kb, mientras *L. satre* 148 posee, además de los 2 comunes, un plásmido de 9,4 Kb, otro de 23 Kb y otros tres mayores de 23 Kb.

De los resultados obtenidos se deduce que las cepas de *L. satre* analizadas poseen plásmidos de un tamaño molecular variable. La técnica miniaturizada y rápida es la más útil, rápida y reproducible para el

aislamiento y visualización de los plásmidos de las bacterias lácticas analizadas, su gran utilidad radica en el posible examen rutinario de muchas cepas bacterianas

IV. 6. 2. - Curado de los plásmidos

Los resultados de las figuras 4. 22 a 4. 24 indican que se obtuvieron plásmidos tanto con la cepa original de *L. sake* como con diversas cepas curadas. Las experiencias de curado se realizaron como se describe en la sección III. 2. 7. 2 de este trabajo, mientras la sensibilidad de cada cepa a la acriflavina se muestra en la Tabla IV. 16. Es interesante conocer la máxima concentración de acriflavina a la que puede desarrollarse cada cepa.

La Tabla IV. 17 muestra el porcentaje de colonias de *L. sake* 31, 77, 90, 148, 177 y 180, que perdieron su actividad inhibidora cuando se cultivaron tres veces consecutivas en presencia de la máxima concentración de acriflavina a la que todavía eran capaces de desarrollarse. La pérdida de la actividad inhibidora fue significativa después del segundo y, especialmente, del tercer cultivo con acriflavina. Con el fin de visualizar el DNA plasmídico empleando la técnica miniaturizada y rápida de aislamiento e identificación de plásmidos, se seleccionaron 5 colonias curadas de las cepas de *L. sake* 31, 77 y 148. El examen de los geles correspondientes a las cepas 31 y 77 revela el mismo número de bandas plasmídicas en las colonias curadas que en las originales (figuras 4. 22 y 4. 23). Los resultados obtenidos al analizar los plásmidos correspondientes a la cepa 148 no son tan uniformes (figura 4. 24), ya que en las muestras procedentes de las cepas curadas falta una, al menos, de las tres bandas de DNA plasmídico de mayor tamaño molecular y, en dos de ellas, no se observan las dos de menor tamaño.

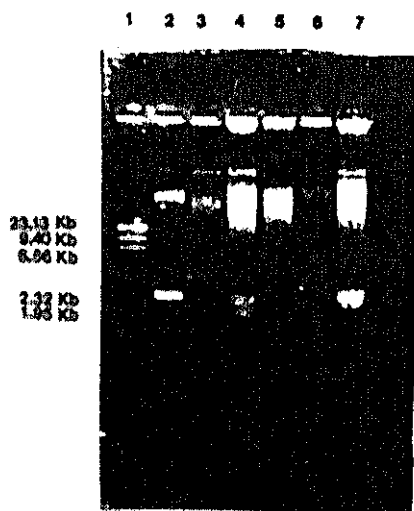


Figura 4. 22. - Visualización de los plásmidos de *L. sake* 31 por electroforesis en geles de agarosa. 1.) ADN del bacteriófago λ , digerido con el enzima Hind III. 2.) cepa original de *L. sake* 31. De 3 a 7.) colonias curadas de *L. sake* 31

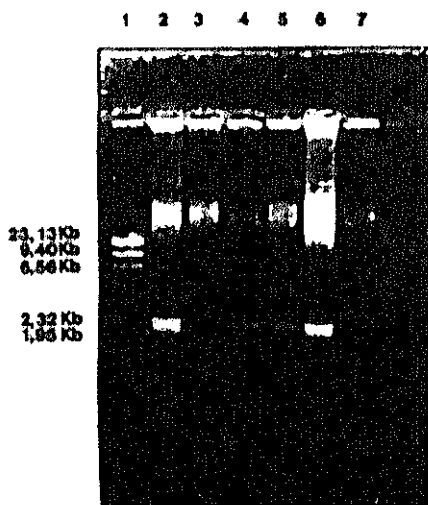


Figura 4. 23. - Visualización de los plásmidos de *L. sake* 77 por electroforesis en geles de agarosa. 1.) ADN del bacteriófago λ , digerido con el enzima Hind III. 2.) cepa original de *L. sake* 77. De 3 a 7.) colonias curadas de *L. sake* 77.

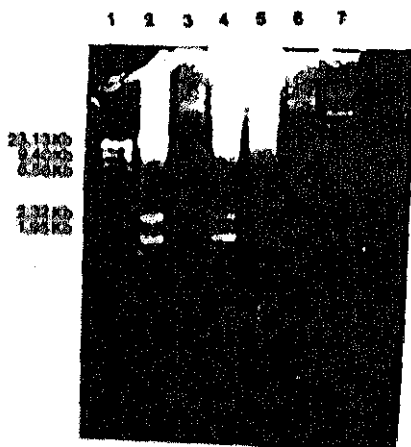


Figura 4. 24. - Visualización de los plásmidos de *L. sake* 148 por electroforesis en gels de agarosa. 1.) ADN del bacteriófago λ , digerido con el enzima Hind III. 2.) cepa original de *L. sake* 148. De 3 a 7.) colonias curadas de *L. sake* 148.

Tabla IV. 16. - Efecto de la concentración de acriflavina en el desarrollo de diversas cepas de *L. sake* en medio MRS.

Cepa	Concentración de acriflavina ($\mu\text{g/ml}$)			
	5	10	20	30
31	+	+	+	++
77	+	+	++	++
90	+	+	+	++
148	+	+	++	++
163	+	+	+	++
177	+	+	++	++
180	+	+	++	++

Tabla IV. 17 - Porcentaje de colonias de las diversas cepas de *Z. saxe* que han perdido su actividad inhibidora tras cultivarse tres veces en presencia de acriflavina.

Porcentaje de colonias no inhibidoras			
Cepa	A	B	C
31	0	0	14
77	0	3	31
90	0	12	31
148	0	3	10
177	0	15	35
180	0	11	21

(A): primer tratamiento con acriflavina, (B): segundo y (C): tercero.

De los resultados obtenidos se deduce que las cepas de *L. sake* analizadas poseen plásmidos de diverso tamaño molecular, sin que de momento se haya profundizado suficientemente para determinar si la síntesis de sustancias inhibitoras de naturaleza proteica se encuentra vinculada a alguno de ellos.

IV. 7. - Actividad inhibitora de los cultivos mixtos de *L. sake* 23 y *L. sake* 148 frente a microorganismos psicrotrofos productores de toxoinfecciones alimentarias.

IV. 7. 1. - Inhibición de *K. enterocolitica*

Los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo, además de los procedentes de otros investigadores de nuestro Departamento implicados en este proyecto de investigación, indican que algunas de las bacterias lácticas aisladas de embutidos crudos curados se desarrollaban a temperaturas de refrigeración y mostraban actividad inhibitora frente al crecimiento de otros microorganismos. Esto nos hizo pensar en la posible utilidad de dichas bacterias para inhibir el desarrollo de microorganismos psicrotrofos, productores de toxoinfecciones alimentarias, presentes potencialmente en la carne y productos cárnicos.

Hemos estudiado, en cultivos mixtos, la actividad antagonista de las cepas de *L. sake* 23 y 148, (la primera no produce sustancias antagonistas exocelulares de naturaleza proteica mientras que sí lo hace la segunda) sobre el desarrollo de *K. enterocolitica* y *List. monocytogenes*.

Los resultados obtenidos demuestran que las tres cepas de *K. enterocolitica* utilizadas (WA, E20 y 14405) son inhibidas por las de *L. sake*

(Tablas IV 18 y IV 20, figuras 4. 25 y 4. 26), observándose en las experiencias realizadas a distintas temperaturas de incubación, una correlación positiva entre número de células de *L. sake* de los cultivos, descenso del pH y concentración de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico, respecto a la inhibición observada. La inhibición es más eficaz cuando las temperaturas de incubación son más altas y el microorganismo inhibidor es *L. sake* 23 en vez de *L. sake* 148, lo que puede deberse a una menor producción de los ácidos L(+) y D(-) láctico por la última cepa (Tabla IV. 19). *X. enterocolitica* 14405 fue la cepa más resistente a la inhibición por las bacterias lácticas.

De acuerdo con la temperatura de incubación las poblaciones de *X. enterocolitica* alcanzadas fueron las siguientes: 5×10^5 ufc/ml a 24 °C, 1×10^6 ufc/ml a 16 °C, 5×10^5 ufc/ml a 8 °C y 5×10^7 ufc/ml a 4 °C. Estas poblaciones se correspondían con recuentos de *L. sake* de, al menos, 1×10^8 ufc/ml. Al cesar el desarrollo de *X. enterocolitica* sus recuentos disminuyen paulatinamente hasta que después de 24 h a 24 °C no se detectan yersinias, como tampoco después de 68 h a 16 °C; no obstante, a esta última temperatura en el cultivo mixto de *L. sake* 148-*X. enterocolitica* 14405, el recuento de yersinias al final de la incubación es de 1×10^4 ufc/ml. Cuando la incubación es a 8 °C, tampoco se detectan yersinias en los cultivos mixtos con *L. sake* 23 a partir de los 12 días, mientras que con *L. sake* 148 nunca se sobrepasan las 1×10^4 ufc/ml. A 4 °C las yersinias no desaparecen en ningún caso, si bien al final de la incubación de los cultivos mixtos las poblaciones de *X. enterocolitica* nunca superan las 1×10^4 ufc/ml en los cultivos con *L. sake* 23, ni las 1×10^6 ufc/ml en los de *L. sake* 148.

Tabla IV. 18. - Recuento final de cepas de *L. sake* y *Y. enterocolitica* en cultivos mixtos desarrollados a diversas temperaturas^a

Cultivo	Temperatura de incubación (°C)							
	4		8		16		24	
	M	Y	M	Y	M	Y	M	Y
23	8,66	-	8,93	-	9,04	-	8,74	-
148	8,62	-	8,96	-	8,91	-	8,56	-
W	-	9,11	-	9,04	-	9,18	-	9,48
E	-	9,08	-	9,00	-	9,11	-	9,32
F	-	9,20	-	9,23	-	9,19	-	9,49
23-W	9,11	4,48	9,11	Nd	9,11	Nd	8,70	Nd
23-E	9,08	4,53	9,08	Nd	9,11	Nd	8,71	Nd
23-F	9,04	4,46	9,00	Nd	8,99	Nd	8,71	Nd
148-W	8,66	7,20	8,70	3,98	9,04	Nd	8,60	Nd
148-E	8,64	7,16	8,67	4,08	9,04	Nd	8,64	Nd
148-F	8,60	7,28	8,77	4,72	9,11	4,60	8,56	Nd

a: Recuento final en Log (u/c/ml). M: Recuento de cepas de *L. sake* en agar MRS. Y: Recuento de cepas de *Y. enterocolitica* en agar YSA con CIN. 23: *L. sake* 23; 148: *L. sake* 148. W: *Y. enterocolitica* WA; E: *Y. enterocolitica* E20; F: *Y. enterocolitica* 14405. Nd: No detectable.

Tabla IV. 19 - pH y concentración final de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico en cultivos mixtos de *L. sake*-*Y. enterocolitica* desarrollados a diversas temperaturas.

Cultivo	Temperatura de incubación (°C)											
	4			8			16			24		
	pH	L	D	pH	L	D	pH	L	D	pH	L	D
23-W	4.49	7.3	1.9	4.46	8.2	2.3	4.36	9.2	3.1	4.33	10.7	2.2
23-E	4.53	7.2	1.6	4.46	7.8	2.3	4.36	9.2	3.0	4.33	11.0	2.7
23-F	4.54	7.3	1.6	4.44	7.7	2.4	4.36	9.1	2.4	4.32	11.4	2.0
140-W	5.10	6.3	Nd	4.50	6.8	2.2	4.44	8.1	2.6	4.38	9.5	2.4
140-E	5.17	6.3	Nd	4.50	6.7	2.2	4.41	8.1	2.5	4.37	9.7	2.8
140-F	5.19	6.3	Nd	4.50	6.7	2.8	4.42	8.3	2.3	4.39	9.9	2.9

L: Ácido L(+) láctico (mg/ml); D: Ácido D(-) láctico (mg/ml). El resto de símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 18.

Tabla IV. 20 - Porcentaje de inhibición de las cepas de *Y. enterocolitica* en cultivos mixtos con *L. sake* tras su desarrollo a diversas temperaturas.

Cepa de <i>L. sake</i>	Temp. de Incubación (°C)	Cepa de <i>Y. enterocolitica</i>		
		W	E	F
23	4	99,9	99,9	99,9
	8	100	100	100
	16	100	100	100
	24	100	100	100
148	4	99,8	99,8	98,8
	8	99,9	99,9	99,9
	16	100	100	99,9
	24	100	100	100

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 18.

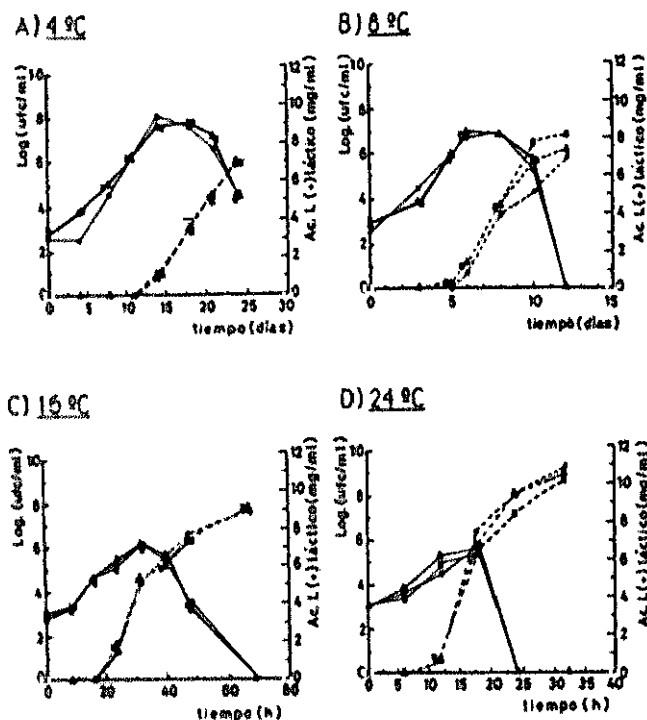
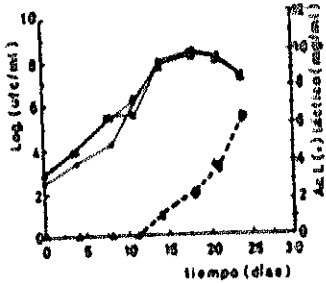
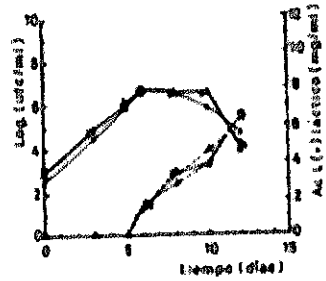


Figura 4.25. - Crecimiento de tres cepas de *Y. enterocolitica* en cultivos mixtos con *L. sake* 23, a diversas temperaturas. (■) 23-W, (▲) 23-E, (●) 23-F. La concentración de ácido L(+) láctico en los mismos cultivos se muestra con línea discontinua (---). A) 4 °C; B) 8 °C; C) 16 °C y D) 24 °C.

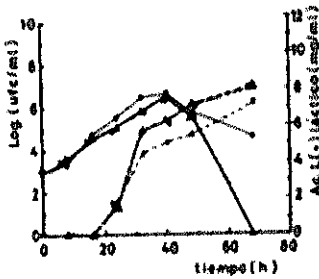
A) 4 °C



B) 8 °C



C) 16 °C



D) 24 °C

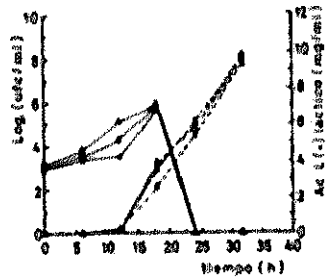


Figura 4. 26. - Crecimiento de tres cepas de *Y. enterocolitica* en cultivos mixtos con *L. sake* 148, a diversas temperaturas. Los símbolos poseen el mismo significado que en la figura 4. 25.

De los resultados obtenidos se deduce que las cepas de *L. sake* analizadas ejercen una acción inhibitoria detectable y cuantificable en el desarrollo de *Y. enterocolitica* a diversas temperaturas en medios de cultivo líquidos. En consecuencia, las cepas de *L. sake* analizadas podrían ser muy útiles, como factores de "seguridad", para inhibir el desarrollo de *Y. enterocolitica* en la carne y en diversos productos cárnicos.

IV 7.2 - Inhibición de *List. monocytogenes*

Las cepas de *List. monocytogenes* analizadas son más resistentes a la acción antagonista de *L. sake* que las de *Y. enterocolitica* (Tablas IV. 21 y IV. 23 y figuras 4. 27 y 4. 28). Sin embargo, las tres son inhibidas cuando se cultivan con cualquiera de las dos cepas de *L. sake*. *List. monocytogenes* NCTC7973 es la cepa más sensible, mientras que el comportamiento de las otras dos cepas frente a los lactobacilos es parecido.

En cultivos mixtos con *L. sake*, *List. monocytogenes* alcanza su recuento máximo a las 10 h cuando se cultiva a 32 °C, a las 12 h cuando lo es a 24 °C, a las 20 h a 16 °C, a los 5 días a 8 °C y a los 16 días a 4 °C. En cultivos con *L. sake* 23, *List. monocytogenes* NCTC7973 alcanza unos recuentos comprendidos entre 1×10^5 y 1×10^6 ufc/ml, para disminuir al final de la incubación hasta menos de 1×10^5 ufc/ml. Las cepas de *List. monocytogenes* LII sv: 4 y Scott A alcanzan en los tiempos citados, niveles de alrededor de 1×10^6 ufc/ml; estos valores se mantienen constantes hasta el final de la incubación. En cultivos con *L. sake* 148, el valor máximo de *List.*

monocytogenes NCTC7973 es, siempre, de unas 10^6 ufc/ml para disminuir al final de la incubación en, al menos, un ciclo logarítmico. Las otras dos cepas de *List. monocytogenes* alcanzan recuentos de más de 1×10^7 ufc/ml; estos niveles permanecen constantes hasta el final de la incubación.

La actividad inhibidora de *L. sake* en *List. monocytogenes* es bastante parecida, a diferencia de lo que ocurría en los cultivos con *V. enterococcica* donde *L. sake* 23 era más eficaz. No obstante, *L. sake* 23 produce más acción láctico que *L. sake* 148 (Tabla IV. 22), por lo que en la actividad inhibidora de esta última cepa la producción de sustancia inhibidora extracelular parece cooperar en la actividad antimicrobiana total de este microorganismo. Al analizar la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de cultivos libres de células de *L. sake* 148 frente a las tres cepas de *List. monocytogenes* (Tabla IV. 24), se observa que el efecto de la sustancia antimicrobiana se manifiesta al final de la fase exponencial y durante la fase estacionaria de crecimiento de *L. sake* 148, siendo mayor a medida que aumenta la temperatura de incubación.

Tabla IV 21. - Recuento final de *L. sake* y *List. monocytogenes* en cultivos mixtos incubados a diversas temperaturas^a

Cultivo	Temperatura de Incubación (°C)									
	4		8		16		24		32	
	M	L	M	L	M	L	M	L	M	L
23	8,84	-	8,98	-	9,18	-	9,18	-	8,94	-
148	8,88	-	9,01	-	9,04	-	9,03	-	8,69	-
1	-	8,78	-	9,11	-	9,32	-	9,44	-	9,52
4	-	9,04	-	9,26	-	9,33	-	9,41	-	9,48
5	-	9,04	-	9,23	-	9,31	-	9,40	-	9,44
23-1	8,99	4,97	9,04	5,04	9,15	3,59	9,00	3,46	8,98	3,00
23-4	9,11	7,65	9,04	6,64	9,20	6,28	8,99	6,54	9,00	6,41
23-5	8,99	7,04	9,04	6,38	9,23	6,08	9,08	6,34	8,90	6,41
148-1	8,84	5,46	9,11	4,90	9,04	3,32	9,23	4,02	8,70	4,00
148-4	8,83	7,00	9,01	6,68	9,15	5,04	9,11	6,69	8,69	7,08
148-5	8,82	6,17	9,00	6,11	9,11	4,11	9,11	6,46	8,75	7,32

^a Recuento final en Log (ufo/ml). M: Recuento de *L. sake* en agar MRS; L: Recuento de *List. monocytogenes* en agar LSAFM. 23: *L. sake* 23; 148: *L. sake* 148; 1: *List. monocytogenes* NCIC7973; 4: *List. monocytogenes* L11 sv-4; 5: *List. monocytogenes* ScottA.

Tabla IV 22 - pH y concentración final de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico en cultivos mixtos de *L. sake* - *List. monocytogenes* desarrollados a diversas temperaturas.

Cultivo	Temperatura de incubación (°C)								
	4			8			16		
	pH	L	D	pH	L	D	pH	L	D
23-1	4.82	7.9	2.1	4.53	8.3	2.6	4.49	9.8	3.3
23-4	4.65	7.4	2.5	4.52	8.7	2.7	4.47	9.3	3.4
23-5	4.62	7.9	2.4	4.50	8.6	2.7	4.47	9.7	3.4
140-1	4.91	6.6	0.8	4.79	7.1	1.8	4.49	8.7	2.5
140-4	4.92	6.5	0.8	4.73	7.2	1.6	4.49	8.3	2.8
140-5	4.84	6.8	0.7	4.72	7.0	1.6	4.49	8.4	2.5

Tabla IV 22 (Continuación)

Cultivo	Temperatura de incubación (°C)					
	24			32		
	pH	L	D	pH	L	D
23-1	4.46	11.0	3.2	4.38	11.6	3.5
23-4	4.45	10.6	3.4	4.38	12.1	3.5
23-5	4.46	10.8	3.2	4.37	12.1	3.1
140-1	4.48	8.5	3.1	4.45	9.6	4.0
140-4	4.48	8.6	3.9	4.44	9.6	4.3
140-5	4.47	8.9	3.9	4.42	9.5	4.0

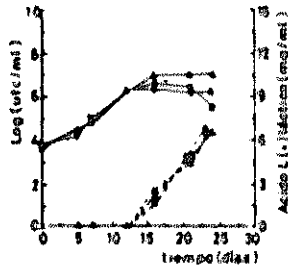
Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV 21

Tabla IV. 23 - Porcentaje de inhibición de las cepas de *List. monocytogenes* en los cultivos mixtos con *L. sake* tras su desarrollo a diversas temperaturas.

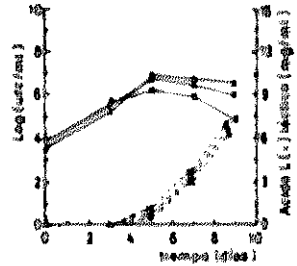
Cepa de <i>L. sake</i>	Temp. de incubación (°C)	Cepa de <i>List. monocytogenes</i>		
		1	4	5
23	4	99,9	97,9	99,0
	8	99,9	99,9	99,8
	16	99,9	99,9	99,7
	24	99,9	98,8	99,1
	32	99,9	99,8	99,9
148	4	99,9	99,5	99,9
	8	99,9	99,7	99,9
	16	99,9	99,3	99,7
	24	99,9	99,9	99,9
	32	99,9	99,2	98,1

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 21.

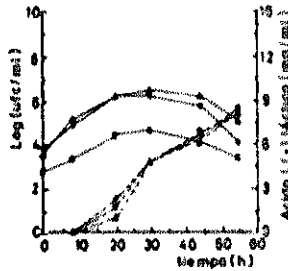
A) 4 °C



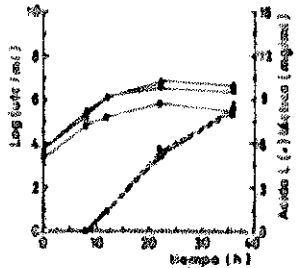
B) 8 °C



C) 16 °C



D) 24 °C



E) 32 °C

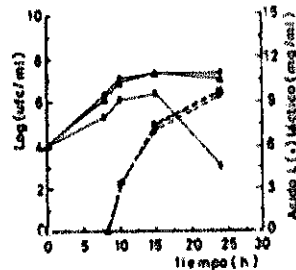


Figura 4.27. - Crecimiento de tres cepas de *List. monocytogenes* en cultivos mixtos con *L. sake* 23, a diversas temperaturas. (■): 23-1, (▲): 23-4, (●): 23-5. La concentración de ácido L(+) láctico en los mismos cultivos se muestra con línea discontinua (---). A) 4 °C; B) 8 °C; C) 16 °C; D) 24 °C y E) 32 °C.

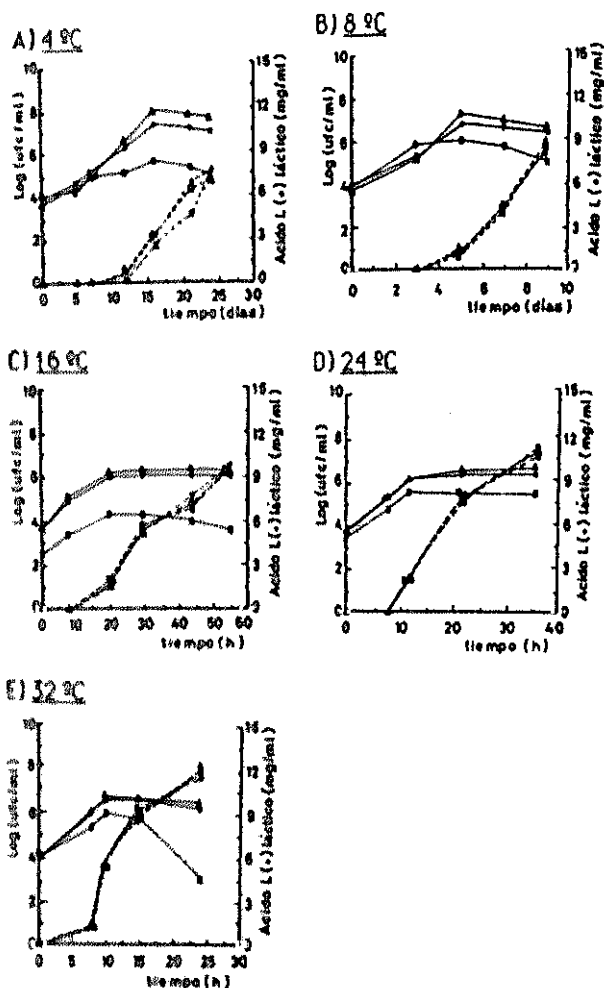


Figura 4.28 - Crecimiento de tres cepas de *L. monocytogenes* en cultivos mixtos con *L. sake* 148, a diversas temperaturas. Los símbolos poseen el mismo significado que en la figura 4.27.

Tabla IV. 24. - Actividad inhibidora total de los sobrenadantes concentrados libres de células de cultivos mixtos de *L. sake* 148-6 y *monocytogenes* incubados a diversas temperaturas. microorganismo indicador *L. fermentum* CECT205.

Temperatura de Incubación (°C)											
4				8				16			
Cultivo			Tiempo (días)	Cultivo			Tiempo (h)	Cultivo			Tiempo (h)
148-1	148-4	148-5		148-1	148-4	148-5		148-1	148-4	148-5	
16	Nd	Nd	5	Nd	Nd	Nd	30	393	393	393	
21	310	229	7	393	310	478	42	1231	1231	1441	
24	1030	830	9	1231	1030	1549	55	2001	2001	2487	

Tabla IV. 24. (Continuación)

Temperatura de Incubación (°C)									
24						32			
Cultivo				Tiempo	Cultivo				
			(h)					(h)	
				(h)	148-1	148-4	148-5		
12	Nd	Nd	Nd	10	393	Nd	564		
22	745	933	838	15	1441	564	1771		
36	2362	2614	2074	24	3996	3279	4145		

Los símbolos poseen el mismo significado que en la Tabla IV. 21.

IV. 8. - Caracterización parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449

IV. 8. 1. - Efecto de diversos enzimas proteolíticos en la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de *L. sake* 449

El efecto de diversos enzimas proteolíticos en la actividad antimicrobiana de los cultivos concentrados libres de células de *L. sake* 449 se evaluó de la manera descrita en la sección III. 2. 9. 1; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. 25. Como puede observarse los enzimas tripsina, pepsina, papaína, proteasa II y proteasa XIV, anulan completamente la actividad inhibidora exocelular de la cepa analizada, de lo que se deduce que la sustancia antimicrobiana posee una estructura proteica.

IV. 8. 2. - Termoresistencia de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de *L. sake* 449

Para evaluar la termoresistencia de la actividad inhibidora de los sobrenadantes concentrados de *L. sake* 449, se vertieron alícuotas de 0,1 ml que se calentaron en viales de vidrio durante periodos de tiempo variables, dependiendo de la temperatura empleada. En la figura 4. 29 se muestran los resultados de la inactivación térmica de la actividad antimicrobiana de interés a 80, 100, 121, 135 y 150 °C. De ellos se desprende:

1. A temperaturas menores de 100 °C la actividad inhibidora permanece prácticamente constante durante el tratamiento térmico.

Tabla IV 25 - Inactivación de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 449 con diversos enzimas proteolíticos

Enzima	Concentración del enzima (mg/ml)	Actividad Inhibidora Total (mm ² /ml)	Actividad Inhibidora Residual ^a (%)
Tripsina	1	1885	30
	5	0	0
Pepsina	1	0	0
	5	0	0
Papaina	1	3703	59
	5	0	0
Proteasa II	1	0	0
	5	0	0
Proteasa XIV	1	0	0
	5	0	0
Control	-	6283	100

a La actividad inhibidora residual se calcula dividiendo la actividad inhibidora total de las soluciones tratadas con el enzima por la actividad inhibidora de la solución control multiplicada por 100.

2. A temperaturas de 100 °C o mayores, la disminución de la actividad inhibidora se ajusta a ecuaciones cinéticas de primer orden.

Los parámetros cinéticos de termodestrucción de la actividad antimicrobiana, denominados valores "D", " $t_{1/2}$ " y "Z" se calcularon a partir de los resultados experimentales de la inactivación térmica (figura 4. 29), de la manera descrita en la sección III. 2. 9. 2. 1 de este trabajo.

Los valores "D" a los 80, 100, 121, 135 y 150 °C fueron de 2002; 123; 27; 6,4 y 5,1 minutos, respectivamente, y los de $t_{1/2}$, a las mismas temperaturas, de 1387; 85,6; 19,1; 4,4 y 3,5 minutos. El valor "Z" obtenido de la recta de regresión obtenida al representar gráficamente el logaritmo de los valores "D", previamente determinados, en función de la temperatura a la que fueron obtenidos fue de 26,7 °C.

IV. 8. 3. - Determinación de la actividad antimicrobiana de *L. sake* 449 en diversos medios de cultivo

La actividad antimicrobiana del sobrenadante concentrado de *L. sake* 449, se evaluó en diversos medios de cultivo empleando como microorganismo indicador *L. fermentum* CECT285. La figura IV. 30 muestra los resultados obtenidos. De ellos se deduce que no se detecta actividad antimicrobiana cuando *L. sake* 449 se desarrolla en medio BHI, mientras que en medio APT, tanto solo como suplementado, tiene lugar la síntesis de dicha actividad antimicrobiana. La actividad inhibidora es ligeramente menor cuando *L. sake* 449 se cultiva en diversos medios mínimos, aunque no se aprecian diferencias significativas entre ellos.

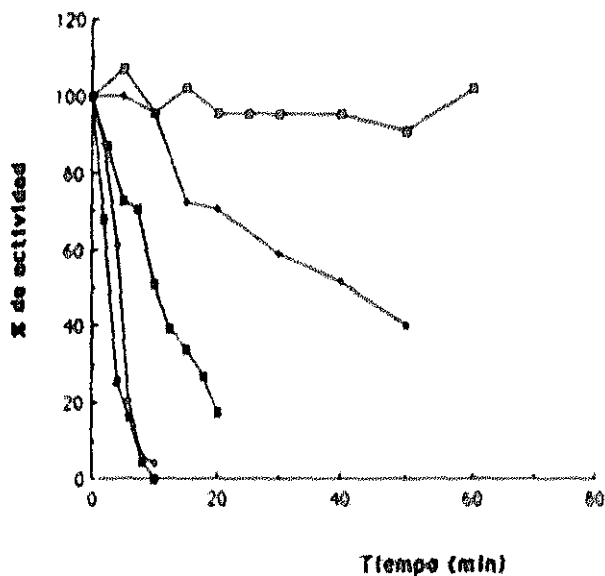


Figura 4. 29 - Inactivación de la actividad antimicrobiana de *Z. sare* 449, tras el calentamiento de la misma a 80 °C (■), 100 °C (*), 121 °C (■), 133 °C (○) y 150 °C (●)

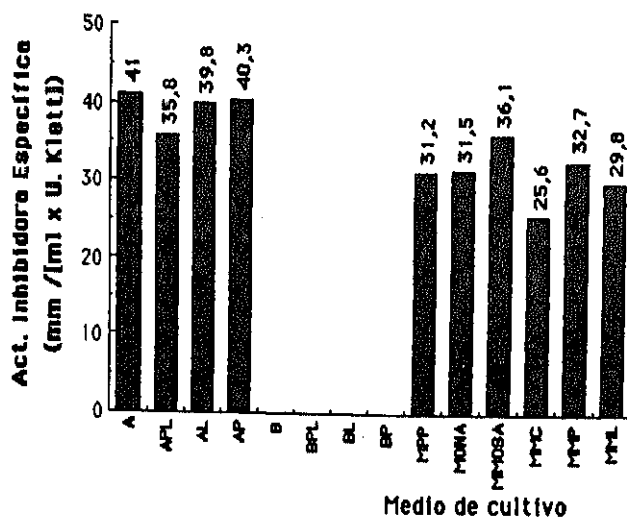


Figura 4. 30.- Actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449 crecido en diversos medios de cultivo. A), APT; B), BHI. Los sufijos P, L ó PL indican que los medios están suplementados con Peptona, "Lab-Lemco Powder" o ambos. MPP= Medio Mínimo con Peptona y Proteosa; MONA= Medio Mínimo con Triptona; MMOSA= Medio Mínimo con Triptosa; MMC= Medio Mínimo con Caseína.

IV B 4. - Mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449

La adición de un pequeño volumen del sobrenadante concentrado de *L. sake* 449 a un cultivo de *L. fermentum* CECT285 en medio líquido APT, inhibe rápidamente su desarrollo pero no su viabilidad, lo que no ocurre cuando se emplea el mismo volumen de un sobrenadante concentrado de *L. sake* 23, lactobacilo que no posee actividad antimicrobiana mediada por sustancias exocelulares de naturaleza proteica (Tabla IV. 26). Los resultados obtenidos indican que la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 449 posee una acción bacteriostática definida, al menos, sobre *L. fermentum* CECT285.

IV. 9. - Purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449.

Una vez conocida la naturaleza proteica de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, así como su producción en medios de cultivo mínimos definidos se procedió a su purificación parcial empleando técnicas de cromatografía de filtración en geles, proceder que separa las moléculas proteicas en función de su tamaño molecular.

El sobrenadante concentrado libre de células del cultivo de *L. sake* 449, se purificó parcialmente en una columna de Sephadex G-150. El resultado de la purificación se refleja en la figura 4. 31., en la que se muestran la actividad inhibidora y la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas. Como puede apreciarse la actividad inhibidora se eluye con el frente cromatográfico, se mantiene durante la purificación y se detecta, incluso durante la elución de los componentes de bajo peso molecular del medio de cultivo. Esto significa

que la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449 se encuentra formando agregados de un tamaño molecular variable.

Con el objeto de resolver los agregados proteicos que forman la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, las fracciones cromatográficas 34 a 79, eluidas de la columna de Sephadex G-150, se concentraron por liofilización y se resuspendieron en tampón de ácido cítrico-fosfato, de pH 5,6 que contiene una concentración de urea 6 M. La muestra se depositó en una columna de Sephadex G-75, eluyéndose con tampón de elución con una concentración de urea 0,1 M. Los resultados obtenidos se contemplan en la figura 4. 32, en la que se aprecia una resolución parcial de los agregados proteicos de tamaño molecular variable, lo que permite la separación de la actividad inhibidora de los componentes del medio de cultivo. Las fracciones cromatográficas 16 a 32 se trataron de la manera descrita y la muestra concentrada por liofilización y sometida a la acción de altas concentraciones de urea se depositó finalmente en una columna de Sephadex G-50. Los resultados obtenidos se observan en la figura 4. 33, apreciándose que la actividad inhibidora eluye antes que la mayor parte de los componentes del medio de cultivo, lo que indica que aunque la purificación sea parcial, los agregados proteicos resultantes y no resueltos completamente por la acción de la urea, permiten separar la actividad inhibidora de los componentes proteicos del medio de cultivo.

Los valores de purificación y recuperación de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449 (Tabla IV. 27), indican que la purificación por liofilización y cromatografía de filtración en gel no es un método adecuado para purificar la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 449.

Tabla IV. 26 - Efecto del sobrenadante concentrado de *L. sake* 449 y *L. sake* 23 en el desarrollo y viabilidad de *L. fermentum* CECT285

Tiempo de incubación (h)	Microorganismo indicador con sobrenadante de:	
	<i>L. sake</i> 23 (ufc/ml)	<i>L. sake</i> 449 (ufc/ml)
0	5.8×10^5	5.8×10^5
5	6.2×10^5	1.3×10^7

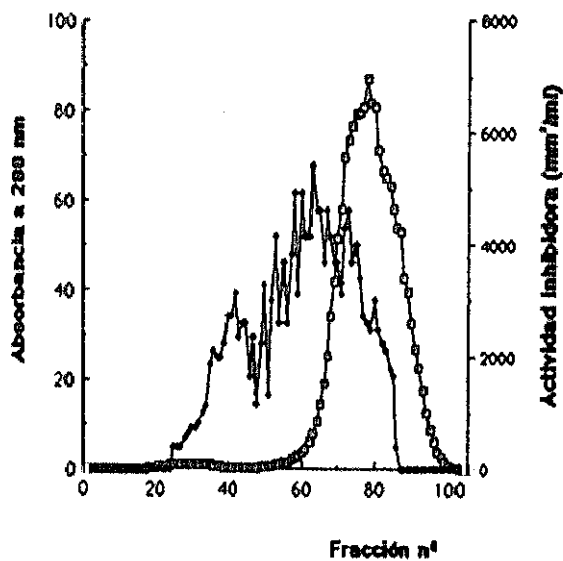


Figura 4.31. - Purificación parcial de la actividad inhibidora de *Z. saette* 449 en Sephadex G-150. Absorbancia de las fracciones a 280 nm (—) y actividad inhibidora (○).

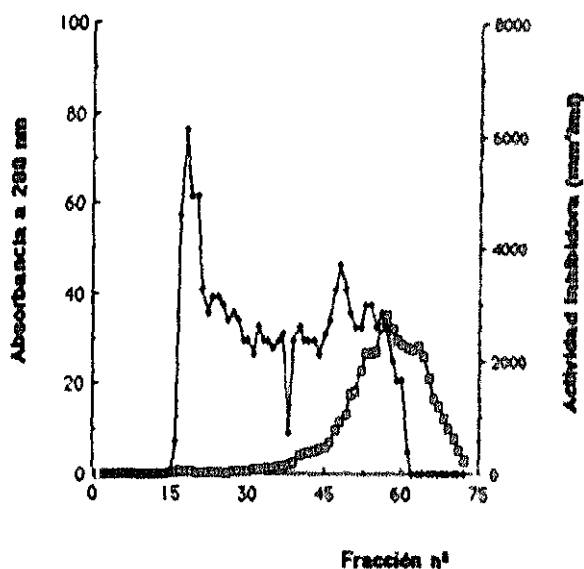


Figura 4. 32. - Purificación parcial de la actividad inhibidora de *L. satre* 449 en Sephadex G-75. Absorbancia de las fracciones a 280 nm (●) y actividad inhibidora (*).

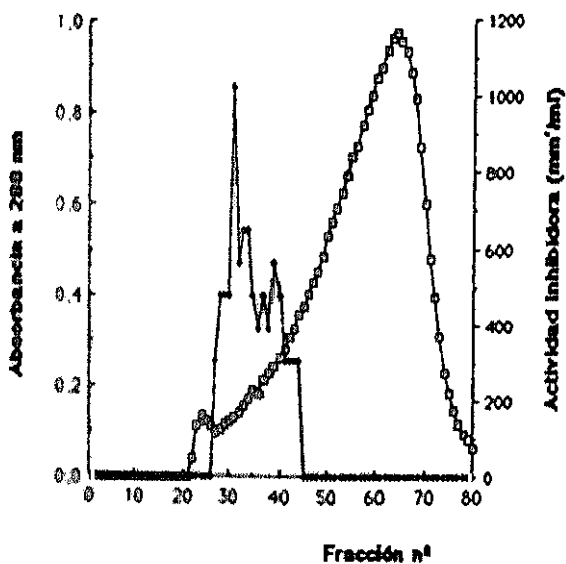


Figura 4.33. - Purificación parcial de la actividad inhibidora de *L. satre* 449 en Sephadex G-50. Absorbancia de las fracciones a 280 nm (□) y actividad inhibidora (×)

Tabla IV. 27 - Purificación parcial de la actividad inhibidora de *L. sativa* 4-49

	Volumen (ml)	Proteína total (mg)	Actividad inhibidora total (cm^2)	Actividad inhibidora específica (cm^2/mg)	Purificación fracción	Recuperación (%)
Sobrenadante	415	7027	13269	1.88	1.88	100
Sobrenadante concentrado	21	6525	6039	1.65	0.86	51
Sephaden 0-150	6.5	652	2000	2.44	1.30	16
Sephaden 0-75	3.5	131	681	5.20	2.76	5
Sephaden 0-50	3.0	39	50	1.30	0.69	0.4

La purificación se calcula como la actividad inhibidora específica de la fracción X / actividad inhibidora específica fracción I. La recuperación se calcula como la actividad inhibidora total de la fracción X / actividad inhibidora total fracción I, multiplicado por 100.

IV. 9.1. - Determinación del peso molecular por cromatografía de filtración en Sephadex G-50.

El peso molecular de la sustancia antimicrobiana exocelular de *Z. sake* 449, una vez sometida al proceso de purificación parcial previamente descrito, se determinó en primer lugar por cromatografía de filtración en gel de Sephadex G-50.

La cromatografía se realizó de la manera descrita en la sección III. 2. 10. 3. Para ello, 20 mg de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada se disolvieron en 3 ml de tampón de ácido cítrico-fosfato de pH 5,6 con urea 6 M, que se depositaron en una columna (1,6 x 90 cm) de Sephadex G-50. Una vez determinadas la absorbancia a 280 nm y la actividad antimicrobiana de las fracciones eluidas, el peso molecular de la sustancia inhibidora se determinó por interpolación en una gráfica que representaba la elución de las proteínas estándar de masa molecular conocida en función del logaritmo de su peso molecular (figura III. 6). El peso molecular aparente resultante fue de 30.979 daltons.

IV. 10. - Determinación del peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.

El sobrenadante con actividad antimicrobiana exocelular de *Z. sake* 449, se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE), según las técnicas de Swank y Munkres (1971) y de Laemmli (1970). La primera, utiliza geles que contienen una concentración elevada de poliacrilamida (20 %) y urea (8 M) con el objeto de resolver cadenas polipeptídicas de bajo peso molecular, mientras la segunda, que utiliza geles que no contienen urea, se

utiliza mucho en la separación electroforética de proteínas de un tamaño molecular medio o elevado. Ambas técnicas se utilizan en la separación electroforética de cadenas polipeptídicas y, por lo tanto, en la visualización de la homogeneidad de las proteínas purificadas, así como en la determinación de su peso molecular.

La figura 4. 34 muestra un electroferograma, obtenido según la técnica de Swank y Munkres (1971), de la sustancia parcialmente purificada de *L. sake* 449. Muestras con 50 y 100 µg de la sustancia antimicrobiana disueltas en tampón de solubilización se depositaron en columnas cromatográficas cuyos geles contenían un 20 % de poliacrilamida y urea 8 M. Los resultados obtenidos indican la falta de fragmentos polipeptídicos de bajo peso molecular y la resolución de un fragmento polipeptídico de un tamaño molecular mayor que el del fragmento polipeptídico estándar de mayor peso molecular (16.900 daltons).

En la figura 4. 35 se muestra un electroferograma, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 449 obtenido según la técnica de Laemmli (1970). Alícuotas que contenían 5, 10 y 15 µg de la sustancia antimicrobiana en tampón de solubilización se depositaron en columnas cromatográficas cuyos geles contenían 12 % de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico. Terminada la electroforesis, y una vez teñidos los geles con reactivo de plata, se apreció la existencia de un fragmento polipeptídico único de un peso molecular aparente de 31.346 daltons.

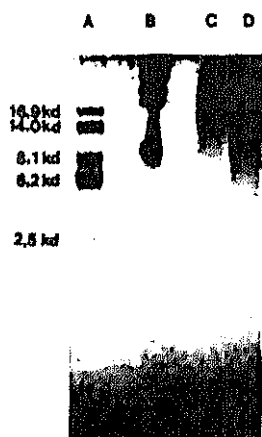


Figura 4.34. - Electroforesis en geles de poliacrílamida con dodecil sulfato sódico y urea, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *L. sake* 449. A) Proteínas estándar de bajo peso molecular. B) Proteínas estándar de alto peso molecular. C y D) 50 y 100 μ g, respectivamente, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada.

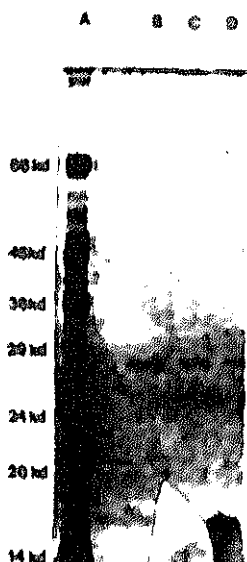


Figura 4.35 - Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilo sulfato sódico y urea, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada de *Z. sare* 449. A) Proteínas estándar (de arriba a abajo, 66, 45, 36, 29, 24, 20 y 14,2 Kiledaltonas). B, C y D) 15, 10 y 5 μ g, respectivamente, de la sustancia antimicrobiana parcialmente purificada.

IV. 11. - Concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449.

La concentración inhibidora mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449 frente a diversos microorganismos, se determinó de la manera descrita en la sección III. 2. 12. Los resultados se muestran en la Tabla IV. 28. La CIM de la sustancia antimicrobiana en los microorganismos indicadores oscila entre 1 y 4 mg/ml, siendo la cepa de *S. aureus* FR1349 y la de *C. perfringens* 376 las resistentes a esta acción.

Tabla IV. 28. - Concentración Inhibidora Mínima (CIM) de la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449 en diversos microorganismos.

Microorganismo Indicador	Concentración inhibidora mínima (mg/ml)
<i>L. fermentum</i> CECT285	2
<i>C. divergens</i> LV13	4
<i>List. monocytogenes</i> NCTC7973	2
<i>List. monocytogenes</i> LI5 sv 1/2	1
<i>List. monocytogenes</i> Scott A	4
<i>S. aureus</i> FRI137	4
<i>S. aureus</i> FRI349	Nd
<i>S. aureus</i> FRI362	2
<i>C. botulinum</i> 551	2
<i>C. perfringens</i> 376	Nd

Nd: Actividad inhibidora no detectable.

CAPITULO V

DISCUSION

V. 1. - Aislamiento de bacterias lácticas de embutidos crudos madurados.

En la realización de este trabajo que pretende el aislamiento y caracterización parcial de bacterias lácticas que aseguren la calidad higiénica de la carne y productos cárnicos, se procedió inicialmente al aislamiento de estas bacterias de embutidos crudos madurados. La elección de estos embutidos como fuente de los microorganismos de interés se debe a que las bacterias lácticas aisladas de estos alimentos están mejor adaptadas a las condiciones existentes en la carne y productos cárnicos que las aisladas de otras fuentes, como las de origen lácteo y vegetal (Schilling y Lücke, 1989a).

Además las bacterias lácticas son, invariablemente, el grupo microbiano predominante en la mayoría de los productos cárnicos y en las carnes envasadas a vacío, constituyendo entre el 75 y el 95 % de su población bacteriana total (Mol y col., 1971; Kitchell y Shaw, 1975; Reuter, 1975; Hitchener y col., 1982; Shaw y Harding, 1984; Korkeala y Mäkelä, 1989). Los resultados de estos investigadores coinciden con los nuestros (Tabla IV. 1), que indican que la mayor parte de la microflora de los embutidos crudos curados analizados estaba constituida por bacterias lácticas. El número de bacterias lácticas presentes en las muestras estudiadas, aproximadamente $1-2 \times 10^7$ ufc/ml, coincide con los resultados obtenidos por otros investigadores en el bacon (Cavett, 1963), en embutidos crudos curados (Egan, 1983) y en carnes envasadas a vacío (Hitchener y col., 1982; Egan, 1983). En muchos productos cárnicos, estas bacterias constituyen el principal componente de su microflora debido a la supresión de el desarrollo de otras especies o grupos bacterianos por antagonismo microbiano (Reuter, 1981).

V. 2. - Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas seleccionadas.

V. 2. 1. - Elección de las pruebas de antagonismo microbiano

V. 2. 1. 1. - Pruebas directas de antagonismo microbiano.

El antagonismo microbiano puede evidenciarse de diversas maneras. En los estudios preliminares, las pruebas de antagonismo se realizan generalmente utilizando medios de cultivo sólidos e implican la detección de la inhibición del crecimiento que ejerce el microorganismo analizado (activo) en el microorganismo o cepa indicador (pasivo) (Tagg y col., 1976). Las dos pruebas empleadas con este propósito son la directa o simultánea y la indirecta o diferida. La densidad y el número de unidades formadoras de colonias del microorganismo indicador son, en cualquier caso, importantes para establecer la sensibilidad del método (Kuttner, 1966).

En la prueba directa, el microorganismo a evaluar y la cepa indicadora se desarrollan al mismo tiempo. Una de las pruebas directas más sencillas es la "prueba de la gota", utilizada originalmente por Gratia (1946), y cuyo empleo está ampliamente difundido (Geis y col., 1983; Daeschel y Klaenhammer, 1985; Gonzalez y Kunka, 1987; Raccach y col., 1989; Spelhaug y Harlander, 1989; Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990a). En ella, una gota del cultivo del microorganismo a evaluar se deposita en un medio de cultivo sólido previamente inoculado con el microorganismo indicador. Entre las variantes de este procedimiento se incluye el empleo de pocillos excavados en el medio sólido de las placas que se rellenan con una cantidad conocida del cultivo del microorganismo a evaluar (Sabine, 1963; Tagg y Mc Given, 1971; Tagg y col., 1976; Silva y col., 1987; Harris y col., 1989; Rodríguez y col., 1989).

Otra modificación de gran utilidad es la siembra por picadura de los microorganismos a estudiar en el medio sólido de placas cuya superficie se ha sembrado previamente con el microorganismo indicador (deKlerk, 1967; Gagliano y Hinsdill, 1970; Davey y Richardson, 1981; Barefoot y Kalenhammer, 1983).

Fredericq (1948) fue el primero en utilizar las pruebas diferidas de antagonismo. En este caso, el microorganismo a evaluar se siembra e incuba en un medio sólido durante un cierto período de tiempo, transcurrido el cual se cubre con otra capa de medio que contiene el microorganismo indicador. Las pruebas diferidas son, a menudo, más sensibles que las directas (Tagg y col., 1976).

Como en la prueba directa, una de las variantes de las pruebas diferidas más empleada es la de la "gota" (Andersson y col., 1988; Harris y col., 1989; Schilling y Lücke, 1989; Speilhaug y Hariander, 1989; Ahn y Stiles, 1990a). Durante esta prueba, y para enfatizar la acción de las sustancias inhibidoras difusibles presentes en los cultivos, las células del microorganismo productor de las mismas se inactivan con calor (Gels y col., 1983; Ahn y Stiles, 1990a) o, sobre todo, con vapores de cloroformo (Kekessy y Piquet, 1970; Davey y Richardson, 1981; Gels y col., 1983; Ahn y Stiles, 1990a). No obstante, esto conlleva algunos inconvenientes como el que algunos agentes inhibidores se inactivan al exponerse a los vapores de cloroformo. Brock y col. (1963) demostraron la sensibilidad al cloroformo de una sustancia inhibidora producida por *Enterococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. Los vapores de cloroformo también impiden el empleo de placas de Petri de plástico y el cloroformo residual en los medios de cultivo puede originar resultados erróneos (Kekessy y Piquet, 1970).

Otra alternativa, cuando se sospecha la existencia de sustancias antagonistas difusibles consiste en sembrar el cultivo indicador en una cara del medio de cultivo sólido y el cultivo analizado en la opuesta, ya sea empleando el sistema de gotas (Kekessy y Piguet, 1970) o de pocillos (Tagg y Mc Given, 1971; Barefoot y Klaenhammer, 1983; Spelhaug y Harlander, 1983). Una ventaja de este método es que así se excluye la actividad inhibidora debida a bacteriófagos (Tagg, 1976).

Tanto en las pruebas de antagonismo directo, como diferido, es recomendable colocar los cultivos de los microorganismos a analizar en pocillos abiertos en los medios sólidos de las placas, ya que si se depositan el mismo número de microorganismos, pueden establecerse comparaciones entre los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas. Otra ventaja de este método es el incremento de su sensibilidad, puesto que entre el microorganismo estudiado y las cepas indicadoras únicamente se interpone una capa fina de agar; esto, además, excluye la inhibición debida a bacteriófagos, que son entidades no difusibles (Tagg y Mc Given, 1971). Por todo ello, se eligió este método para la realización de las pruebas de antagonismo, tanto directo como diferido, de las 50 bacterias lácticas aisladas y seleccionadas de los embutidos crudos curados (sección IV. 1).

V. 2. 1. 2. - Antagonismo de los sobrenadantes libres de células

Cuando en las pruebas de antagonismo microbiano se emplean cultivos de los microorganismos problema, no es fácil identificar la causa del mismo (Tagg y col., 1976). En la identificación de bacterias lácticas productoras de

sustancias antagonistas difusibles es importante excluir de los ensayos no solamente a los microorganismos productores tales sustancias, sino también, a otros productos con actividad inhibidora.

Los fenómenos que mimifican la actividad de las bacteriocinas en las pruebas de antagonismo bacteriano pueden eliminarse utilizando sobrenadantes libres de células neutralizados o dializados. Los sobrenadantes se obtienen por centrifugación de los cultivos y filtración por filtros de 0,22 o 0,45 μm de diámetro de poro. La neutralización de la actividad antagonista de los ácidos orgánicos puede realizarse ajustando el pH de los sobrenadantes, con NaOH o HCl, a un valor próximo a la neutralidad (pH 7,0) (Gels y col., 1983; Barefoot y Klaenhammer, 1984; Rodríguez y col., 1989; Nielsen y col., 1990; Mortvedt y Nes, 1990) o bien dializando los sobrenadantes por membranas que permiten la difusión de sustancias de un tamaño molecular menor de 6000 daltons. La diálisis puede ir precedida de una precipitación de los sobrenadantes con sulfato amónico (Bhunia y col., 1987; González y Kunka, 1987; Ray y col., 1989). El precipitado, constituido fundamentalmente por proteínas, se reconstituye y se dializa. No obstante, la mayoría de los autores prescinden de esta precipitación (Andersson, 1986; Andersson y col., 1988; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989a; Daeschel y col., 1990; Ahn y Stiles, 1990b).

La actividad del peróxido de hidrógeno de los sobrenadantes puede evitarse incubando los cultivos en anaerobiosis (Schillinger y Lücke, 1989) o tratando con catalasa los sobrenadantes libres de células (Barefoot y Klaenhammer, 1983; Murlana y Klaenhammer, 1987; Ferreira y Gilliland, 1988; Schillinger y Lücke, 1989a; Rodríguez y col., 1989; Carminati y col., 1989; Ahn y Stiles, 1990a). Gels y col. (1983) añaden la catalasa

directamente al medio de cultivo del microorganismo indicador.

Los sobrenadantes libres de células también pueden concentrarse con el fin de aumentar su actividad inhibidora. Entre los sistemas de concentración más empleados destacan la evaporación a vacío en rotavapores (Gels y col., 1983; Silva y col., 1987) y la liofilización (Rodríguez y col., 1989).

La actividad inhibidora de los sobrenadantes puede detectarse con cualquiera de las variantes de antagonismo directo e indirecto citadas anteriormente, estando muy difundidos los métodos "de la gota" (Gels y col., 1983; Ray y col., 1989; Carminati, 1989; Ahn y Stiles, 1990a) y la disposición de los sobrenadantes en pocillos (Joerger y Klaenhammer, 1986; Andersson y col., 1988; Ray y col., 1989; Harris y col., 1989; Schillinger y Lücke, 1989; Daeschel y col., 1990; Rammelsberg y Radler, 1990; Ahn y Stiles, 1990a). Otro método muy empleado cuando se investigan bacterias lácticas bacteriocinogénicas consiste en colocar los sobrenadantes en papeles de filtro estériles. Los discos de papel de filtro impregnados con el sobrenadante de interés se depositan en placas de agar sembradas con el microorganismo indicador (Shahani y col., 1976; Ferreira y Gilliland, 1988) o bien se deposita en los papeles una cantidad determinada de los sobrenadantes (Abdel-Bar y col., 1987; Bhunia y col., 1987; Bhunia y col., 1988; Rodríguez y col., 1989). La segunda opción ha sido la utilizada en este trabajo, ya que permite comparar la actividad inhibidora de los diversos sobrenadantes analizados.

V. 2. 2. - Actividad inhibidora de los cultivos de las bacterias lácticas seleccionadas.

Los cultivos de las 50 bacterias lácticas examinadas manifestaron actividad inhibidora frente a alguno de los microorganismos indicadores empleados (figuras IV. 1 a IV. 20). La actividad inhibidora es generalmente mayor cuando los microorganismos a evaluar se desarrollan 24 horas antes que los microorganismos indicadores, lo que coincide con los resultados de Ahn y Stiles (1990a). La sensibilidad de los microorganismos indicadores a la actividad inhibidora de las bacterias lácticas analizadas es variable, lo que demuestra que dicha actividad es característica de cada cepa y no de la especie bacteriana, hecho corriente entre las bacterias lácticas (Schillinger y Lücke, 1989a; Daeschel y col., 1990).

Asimismo, los resultados obtenidos por otros investigadores que han evaluado la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas son muy heterogéneos. Al igual que nosotros, Kozak y col. (1978) observaron que el 100 % de 47 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* eran activas frente a otras dos cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y frente a una de *L. lactis* subsp. *cremoris*. Igual porcentaje obtuvieron Ahn y Stiles (1990a), al examinar la actividad inhibidora de 10 cepas de diversos géneros de bacterias lácticas frente a 10 indicadores que eran, asimismo, bacterias lácticas.

El 63 % de las 52 cepas de *L. acidophilus* analizadas por Barefoot y Klaenhammer (1983), inhibieron el desarrollo de diversas cepas de *L. leichmanni*, *L. bulgaricus*, *L. helveticus* y *L. lactis* porcentaje idéntico al obtenido por Raccach y col. (1989), con 11 cepas de *Lactobacillus* y de *Streptococcus* sp. empleando como indicadores diversas cepas de 6 especies

distintas de bacterias lácticas y 4 cepas de *List. monocytogenes*. De otra parte, únicamente el 15 % de las 79 cepas de *Lactobacillus* sp. examinadas por Rammelsberg y Radler (1990) inhibieron una, al menos, de las 9 cepas indicadoras de *L. brevis*, *P. damnosus* y *Leuc. oenus*. Sin embargo, el porcentaje de cepas inhibidoras registrado por Davey y Richardson (1981) fue aún menor, ya que sólo el 7 % de las 150 cepas de *Lact. lactis* subsp. *cremoris* analizadas, inhibieron el desarrollo de varias cepas de *Lact. lactis* subsp. *cremoris* y *Lact. lactis* subsp. *lactis*.

Schillinger y Lücke (1989a) al evaluar 142 cepas de *L. sake*, 4 de *L. plantarum* y 75 de *L. curvatus*, observaron que el 13, el 75 y el 1 %, respectivamente, eran activas frente, al menos, uno de los 31 microorganismos indicadores empleados; estos resultados contrastan con los de Ahn y Stiles (1990a) y con los nuestros, contraste que llama poderosamente la atención si se tiene en cuenta que en los tres trabajos las bacterias lácticas proceden de una fuente común, los embutidos crudos curados.

Lo expuesto da una idea de la variabilidad existente en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas, hecho que se ve agravado por la escasa uniformidad en las condiciones de trabajo y por lo variado de los microorganismos indicadores empleados. No obstante, un hecho común en los trabajos citados es que las bacterias lácticas analizadas son especialmente activas frente a otras bacterias lácticas y nunca, o de forma excepcional, frente a las bacterias Gram-negativas.

V.2.3 - Actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células.

Los estudios sobre actividad inhibidora de los sobrenadantes libres de células, se realizan generalmente con un número menor de cepas que en V.2.2, ya que éstas se seleccionan entre aquellas cuyos cultivos eran más inhibidores. Los sobrenadantes concentrados libres de células de cultivos de nuestras 8 bacterias lácticas más inhibidoras (Tabla IV.2) carecen de actividad inhibidora frente a *L. fermentum* CECT285, el microorganismo indicador más sensible en los experimentos realizados con cultivos, y frente a varias cepas de *List. monocytogenes* y *S. aureus*, microorganismos productores de toxoinfecciones alimentarias y, por lo tanto, de gran interés en la industria alimentaria. No obstante, a diferencia de lo que sucede con estas 8 cepas, el sobrenadante de la cepa 449, que aislamos con posterioridad a las primeras, sí que mostró una potente actividad antimicrobiana (Tabla IV.2), frente a los mismos microorganismos indicadores.

La actividad inhibidora de los sobrenadantes de cultivos de bacterias lácticas frente a otras bacterias lácticas, a menudo estrechamente relacionadas entre sí, es un hecho ampliamente documentado (Olsen y col., 1983; Barefoot y Kleenhammer, 1984; Joerges y Kleenhammer, 1985; Andersson, 1986; Gonzalez y Kurka, 1987; Bhunia y col., 1987; Schilling y Lucke, 1989a; Harris y col., 1989; Mortvedt y Nes, 1990; Ahn y Stiles, 1990a; Ahn y Stiles, 1990b); es mucho menos frecuente que las bacterias lácticas inhiban el desarrollo de microorganismos patógenos Gram-positivos, como *S. aureus* (Andersson, 1986; Andersson y col. 1988; Bhunia y col., 1988) y *List. monocytogenes* (Bhunia y col., 1988; Carminati, 1989; Schilling y Lucke, 1989a; Harris y col., 1989; Spoelhaug y Harlander, 1989; Ahn y Stiles, 1990b). La mayor parte de los autores citados coinciden en señalar la inmunomodulación

de las bacterias Gram-negativas o las sustancias antibacterianas producidos por las bacterias lácticas analizadas. La excepción mejor conocida la constituyen las cepas de *L. lactis* productoras de nisina (Hurst, 1981). La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células de los cultivos de bacterias lácticas es muy heterogénea y depende de cada cepa en particular (Harris y col, 1989).

V. 2. 4. Efecto de la catalasa en la actividad inhibidora de las bacterias lácticas seleccionadas

Los resultados de la Tabla IV. 3 indican que la cepa número 2 es la única cuya actividad inhibidora parece deberse en gran parte, a la producción de peróxido de hidrógeno. La capacidad de algunas bacterias lácticas de producir peróxido de hidrógeno es una propiedad indeseable, especialmente si en las emulsiones cárnicas existe un alto contenido de oxígeno, si se emplea mucha grasa, o si la actividad de los enzimas que degradan el peróxido de hidrógeno es pequeña (Schillinger y Lücke, 1987a). En tales casos, la presencia en la carne y productos cárnicos de microorganismos productores de agua oxigenada produce alteraciones de su color o un enranciamiento precoz.

Las bacterias lácticas difieren en su capacidad de producir y degradar el peróxido de hidrógeno. Hastings y Holzapel (1987), observaron que el 50 % de las cepas de *L. sake* de origen cárnico producían peróxido de hidrógeno y, de ellas, la mayoría lo hacía muy débilmente. La falta de una buena selección de las bacterias lácticas autóctonas explica, en parte, por qué *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* son los microorganismos más empleados como cultivos iniciadores, en la elaboración de productos cárnicos, y no *L. sake* o *L. curvatus*, especies más competitivas (Lücke y Hechelmann, 1987).

V 3 - Identificación y caracterización bioquímica parcial de las bacterias lácticas con actividad antimicrobiana

Cuando se aíslan bacterias lácticas y en particular lactobacilos, de la carne y de los productos cárnicos no es posible clasificarlos adecuadamente siguiendo los sistemas de identificación empleados clásicamente, ya que éstos se basan en las propiedades de los aislamientos de otras fuentes (Jóns Jensen, 1919; Rogosa, 1970, Sharpe, 1979). Hasta muy recientemente estas cepas que son difíciles de identificar se englobaron bajo la denominación de "estreptobacterias o lactobacilos atípicos" (Thornley y Sharpe, 1959, Reuter, 1975, Sharpe, 1979). No obstante, como sugirió Ingram (1973), el término de "estreptobacterias atípicas" es desafortunado ya que las bacterias lácticas de origen cárnico no son menos típicas que las demás, en todo caso lo serán los criterios de identificación y clasificación, debido a la ignorancia de las propiedades de las especies de origen cárnico.

Con el transcurso del tiempo se han realizado diversos intentos de identificar y clasificar las estreptobacterias de origen cárnico (Reuter, 1975; Kitchell y Shaw, 1975; Hitcheney y col., 1982). Todos ellos se basan en reacciones bioquímicas variables, que al no emplear métodos numéricos en el establecimiento de los grupos, han llevado a la creación de grupos innecesariamente complicados y arbitrarios (Shaw y Harding, 1984). No obstante, en 1989, Schillinger y Lücke elaboraron un esquema de identificación rápida de lactobacilos de origen cárnico, basado en la apreciación de características fisiológicas, la mayor parte de las cuales son fácilmente determinables. Este esquema, que se muestra en la figura 5.1, incluye especies recientemente caracterizadas, como *L. sakei*, *L. curvatus*, *C.*

piscicola y *C. divergens* por lo que lo elegimos para la identificación y clasificación de nuestros aislamientos. Nuestras cepas, cuyas características morfológicas y bioquímicas más significativas se aprecian en las Tablas IV. 4 y IV. 5, son bacilos homofermentativos, crecen a 15 °C, producen ácido L(+) láctico y D(-) láctico, no fermentan el manitol y fermentan la ribosa, la sacarosa y la trehalosa, por lo que siguiendo el esquema de la figura 5. 1, se clasificaron como *L. sake*. Las características descritas coinciden con las señaladas por Kandler y Weiss (1986) y por Champomier y col. (1987) para *L. sake*.

Ninguna de las cepas aisladas crece en medio MRS de pH 3,9, a excepción de la 449, que lo hace débilmente. Schillinger y Lücke (1987b), han señalado que, aproximadamente, el 11 % de las cepas de *L. sake* no crecen a dicho pH. A este respecto conviene destacar que los lactobacilos incluidos en las "estreptobacterias atípicas" son menos acidificantes y acidotolerantes que los demás (Reuter, 1975; Reuter, 1981).

Todas las cepas analizadas se desarrollan a una concentración de cloruro sódico del 7 %, lo que coincide con los resultados de Champomier y col. (1987), de Schillinger y Lücke (1987b) y de Mortvedt y Nes (1990). Cuando la concentración es del 10 % los resultados son variables; la cepa 29 no se desarrolla, las cepas 2, 11, 20, 23 y 38 crecen débilmente y la 449 se desarrolla bien (Tabla IV. 4). Existen discrepancias en cuanto a la capacidad de *L. sake* de desarrollarse a una concentración de cloruro sódico del 10 %, ya que mientras Schillinger y Lücke (1987b) indican que el 93 % de 131 cepas de *L. sake* crecen a esta concentración de cloruro sódico, Champomier y col. (1987) mantienen que se trata de una característica excepcional.

Las cepas de *L. sake* analizadas muestran una capacidad variable de hidrolizar la arginina, pues mientras las 2, 11, 29 y 38 producen amoníaco a partir de dicho aminoácido, las cepas 20, 23 y 449 no lo hacen (Tabla IV. 4). Schillinger y Lücke (1987b), observaron que la mayoría de las cepas de *L. sake* poseían esta capacidad, lo que concuerda con los resultados de Champomier y col. (1987). Sin embargo, resulta curioso que Kandier y Weiss (1986) describan a *L. sake* como incapaz de hidrolizar la arginina, ya que la cepa que consideraron tipo, la *L. sake* ATCC 15521, carece de esta capacidad. Reuter (1981) concuerda con nuestros resultados en que la capacidad de hidrolizar la arginina varía mucho entre las cepas de *L. sake* y *L. curvatus*.

La capacidad de algunos lactobacilos de producir ácido sulfhídrico es una característica perjudicial, ya que su proliferación en los alimentos origina su deterioro (Egan y col., 1989). Ninguna de las cepas que aislamos produjo ácido sulfhídrico en ninguno de los diversos medios en los que se estudió esta propiedad (Tabla IV. 4). No obstante, Schillinger y Lücke (1987b), observaron que el 50 % de las cepas de *L. sake* que estudiaron producían ácido sulfhídrico.

Las cepas de *L. sake* comparten una serie de características básicas que las diferencian de otras especies de lactobacilos. Sin embargo, poseen otras propiedades de las que la variación entre cepas es la nota predominante. Las discrepancias entre la cepa tipo y las propiedades de las cepas de origen cárnico explican las dificultades de muchos autores para identificar sus aislamientos (Reuter, 1981). En este sentido, la fermentación de la arabinosa, amigdalina, escutina, arbutina, salicina, celobiosa, maltosa y lactosa, que en la descripción de *L. sake* en el Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandier y Weiss, 1986) se admiten como pruebas positivas de identificación,

se consideraron variables en las 13 cepas de esta especie analizadas por Champomier y col (1987) Quizá esto explique la variabilidad con que nuestras cepas fermentan determinados azúcares.

Que todos nuestros aislamientos se hayan identificado como *L. sake* no es sorprendente, ya que algunos investigadores han observado que esta especie puede convertirse en la predominante a las temperaturas de maduración normalmente empleadas en Europa en la elaboración de los embutidos crudos curados (Lücke, 1986; Schillinger y Lücke, 1987a). Lücke y Hechelmann (1987) apoyan esta observación al confirmar el predominio natural de *L. sake* y *L. curvatus* en embutidos crudos europeos madurados tradicionalmente.

Holy y Holzapfel (1988) también han observado que entre las bacterias lácticas aisladas de carne de vacuno, envasada a vacío y almacenada a temperaturas de refrigeración, existe un fuerte predominio de *L. sake*, constituyendo los aislamientos de *L. sake*, *L. curvatus* y *L. bavaricus* casi el 80 % del total de bacterias lácticas identificadas. Conviene recordar que *L. bavaricus* puede considerarse como una variante de *L. sake* que carece de racemasa (Kandler y Weiss, 1986). Asimismo, Montel y col (1989) consideran a *L. sake* como la bacteria láctica más abundante en la carne de vacuno. Korkeala y Mäkelä (1989), utilizando el esquema de clasificación de Schillinger y Lücke (1987b), han establecido que *L. sake* es la bacteria láctica mayoritaria en los productos cárnicos envasados a vacío. Hastings y Holzapfel (1987) también han observado que *L. sake* es la especie predominante en la carne picada de vacuno radurizada (5 K8y), adjudicando a esta especie 100 de las 113 cepas aisladas.

Globalmente consideradas, las "estreptobacterias atípicas", también han constituido, de acuerdo con numerosos estudios anteriores, el grupo bacteriano más numeroso en el bacon (Cavett, 1963), en una gran variedad de productos cárnicos (Reuter, 1975) y en carnes envasadas a vacío (Mol y col., 1971; Reuter, 1975; Kitchell y Shaw, 1975; Hitchener y col., 1982; Holzapfel y Gerber, 1986). Su presencia se ha considerado deseable, ya que participan en el aumento de su vida útil (Egan, 1983). Recientemente y como contribución a una mejor comprensión de la clasificación de las bacterias lácticas de origen cárnico, Champomier y col. (1987) han comprobado que los 6 grupos de lactobacilos aislados de productos cárnicos por Laban y col. (1978) y la mayoría de los integrantes del grupo II de Shaw y Harding (1984), encajan perfectamente en la descripción tipo de *L. sake*.

V. 4. - Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *L. sake* a diversas temperaturas.

Todas las cepas de *L. sake* analizadas se desarrollan a 4 y 8 °C, a excepción de la cepa 449 que no lo hace a 4 °C (Tablas IV. 6 a IV. 10). Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros investigadores. Schillinger y Lücke (1987b) y Champomier y col. (1987) observaron que el 99 % de las cepas de *L. sake* estudiadas por los primeros y, todas las evaluadas por los segundos, crecieron a 4 °C. Por el contrario, sólo el 50 % de las cepas de *L. plantarum* se desarrollan, y débilmente, a esta temperatura (Reuter, 1981; Schillinger y Lücke, 1987b). Hastings y Holzapfel (1987) han observado que ninguna de las 100 cepas de *L. sake* aisladas de carne radurizada se desarrollaban ni a 4 °C ni a 8 °C. Quizás esta anomalía se deba a alteraciones de la fisiología celular de los lactobacilos debida a su radurización.

Actualmente, *L. sake* y *L. curvatus* son considerados como microorganismos psicrotófos, siendo los que crecen a temperaturas más bajas de todas bacterias lácticas (Reuter, 1981; Kandier y Weiss, 1988).

De nuestras cepas de *L. sake* ninguna crece a 45 °C, a excepción nuevamente de la 449 (no se muestran los resultados). La mayoría de los estudios realizados hasta la fecha, coinciden en señalar que la mayor parte de las cepas de *L. sake* no se desarrollan a 45 °C (Reuter, 1975; Champenier y col., 1987; Hastings y Holzapfel, 1987; Korkeala y Mäkelä, 1989) o lo hacen muy débilmente (Reuter, 1981). Sin embargo, Schillinger y Lücke (1987b) han observado que el 87 % de las cepas de *L. sake* y el 77 % de las de *L. curvatus*, crecen a dicha temperatura. La mayoría de las cepas de *L. plantarum* si se desarrollan a 45 °C (Reuter, 1981; Schillinger y Lücke, 1987b).

La temperatura óptima de crecimiento de las distintas bacterias lácticas constituye un parámetro de gran importancia tecnológica en la elección de cultivos iniciadores cárnicos. Así, mientras *P. acidilactici* se desarrolla bien a temperaturas superiores a 40 °C, las temperaturas óptimas de crecimiento de *P. pentosaceus* y de *L. plantarum* se sitúan entre 30 y 35 °C, siendo las de *L. sake* y *L. curvatus* algo menores (Lücke y Meckelmann, 1987). En un estudio comparativo de diversas bacterias lácticas de cultivos iniciadores cárnicos (*L. sake*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *P. acidilactici* y *P. pentosaceus*), Schillinger y Lücke (1989b) comprobaron que *L. sake* era la especie que se desarrolla más rápidamente y con mayores recuentos en una mezcla cárnica mantenida a 20 °C. La diferencia de desarrollo era especialmente significativa respecto a los lactobacilos "nativos" de un lote control, al que no se le había adicionado ningún cultivo iniciador.

V. 5. - Síntesis y cinética de producción de metabolitos finales

V. 5. 1. - Ácidos L(+) láctico y D(-) láctico

Los resultados de las Tablas IV. 11 a IV. 15 indican que en las cepas de *L. sake* que hemos seleccionado, la producción de ácido láctico, tanto L(+) como D(-), aumenta al hacerlo la temperatura de incubación. Además, la producción de ácido láctico es proporcional a la masa celular final, por lo que la productividad de ácido láctico a una misma temperatura es igual en las diversas cepas, ya que la menor producción por una cepa se corresponde con una menor masa celular de esa misma cepa y viceversa.

En un estudio realizado con 4 cepas de *L. plantarum*, Montville y col. (1987) demostraron, que las cepas que producían más ácido láctico alcanzaban una masa celular mayor, por lo que los coeficientes de productividad eran similares en las 4 cepas, independientemente de la cantidad de ácido láctico producido. Estos investigadores comprobaron que las diferencias en la producción de lactato no se debían a variaciones en la capacidad glicolítica de las diversas cepas, sino que se relacionaban con la capacidad de cada cepa de producir mayor o menor masa celular.

Schittinger y Lücke (1989b) han demostrado que la menor capacidad de *A. acidilactici* y *A. pentosaceus* respecto de *L. sake* y *L. curvatus* para desarrollarse a 20 °C, es la responsable de que la acidez desarrollada por los primeros en una mezcla cárnica sea menor. Los autores citados demostraron que las cepas de *L. sake* degradaban completamente los azúcares de una mezcla cárnica tras 3 días de incubación a 20 °C, produciendo una concentración de ácido láctico de 5,3 mg/g. Este valor es aproximadamente la

mitad que el producido por nuestras cepas a una temperatura similar (Tabla IV 14). No obstante, debe recordarse que, en los sistemas cárnicos las bacterias lácticas deben producir mayor cantidad de ácido láctico que en los medios de cultivo corrientes para que la disminución del pH sea equivalente (Vignolo y col., 1988; Llepe, 1986).

También Obradovic y col. (1989) en un estudio realizado con embutidos crudos madurados, observaron que la disminución del pH era más rápida cuando en su elaboración intervenía *L. sake*, que cuando lo hacía *L. plantarum*. El mayor desarrollo de *L. sake* y *L. curvatus* a las temperaturas tradicionalmente empleadas en Europa en la maduración de embutidos crudos curados (20-22 °C), hace que estas cepas conviertan los escabos apócricos presentes en la mezcla cárnica en ácido láctico, de una manera particularmente rápida.

La cepa de *L. plantarum* utilizada como bacteria láctica control en nuestro trabajo, produce a 30 °C una mayor cantidad de ácido láctico que las cepas de *L. sake*, a diferencia de lo que sucedía a otras temperaturas. Daly y col. (1973) observaron que la actividad inhibidora de *L. plantarum* y *P. acidilactici* frente a *S. aureus* era menor a 21 °C que a 30 o 37 °C, lo que atribuyeron a la menor producción de ácido láctico a la temperatura más baja. Vignolo y col. (1988) evaluaron la capacidad de *L. plantarum* de producir ácido láctico a diversas temperaturas, viendo que era máxima a 30 °C, salvo en algunas cepas en las que tenía lugar a 37 °C.

El ácido láctico producido por nuestras cepas está constituido, en la mayoría de los casos, por un 75 % aproximadamente del isómero L(+) y un 25 % del D(-). Hastings y Holzappel (1987) han observado que de 100 cepas de *L.*

sobre desarrolladas a 30 °C, prácticamente todas producían entre un 50-80 % del isómero L(+) y entre un 20-50 %, respectivamente, del D(-). Sin embargo, en una mezcla cárnica, Schillinger y Lücke (1989b) han visto que tanto una cepa de *L. sake* como otra de *L. curvatus* producían ambos isómeros en la misma proporción.

Los dos isómeros derivan de la actividad de las lactato deshidrogenasas (LDH) NAD-dependientes de la correspondiente estereoespecificidad. En *L. sake*, *L. curvatus* y *L. casei* subsp. *pseudopiantarum* también se ha descrito la existencia de una lactato racemasa (Sletten y Kandler, 1973). La razón de la distinta producción de uno u otro isómero, podría deberse a que la LDH racémica posea actividades L(+) y D(-) diferentes, lo que daría lugar a un exceso de uno de los dos isómeros respecto del otro (Kandler, 1983).

El ácido L(+) láctico es un metabolito formado durante la fermentación láctica de algunos alimentos y tiene la misma configuración que el producido por las células eucariotas. No obstante, en el yogur hay cantidades sustanciales de D(-) lactato (Kroger, 1976; Alm, 1982); en los rumiantes y en la especie humana la presencia de este metabolito reduce el metabolismo celular y causa acidosis. Debido a su menor tasa metabólica, en comparación con la del isómero L(+), y a los efectos secundarios mencionados, la OMS ha recomendado restringir el consumo de productos alimenticios que posean concentraciones altas de D(-) lactato (OMS, 1974). La ingesta máxima diaria aceptable de D(-) lactato es de 100 mg/Kg de peso corporal (Doorey, 1983), lo que significa que es una cantidad difícil de alcanzar por el consumo de productos lácteos o cárnicos fermentados.

V 5.2 - Diacetilo/Acetoina

El diacetilo (2,3 butenodiona), es un metabolito producido por algunas especies y cepas de bacterias lácticas, responsable del aroma característico de la mantquilla, es un compuesto interesante por sus propiedades antimicrobianas (Jay, 1982). Sin embargo, los resultados de este trabajo (sección IV 5.2), indican que ninguna de las cepas analizadas produjo niveles detectables de diacetilo/acetoina en los medios de cultivo empleados.

Las bacterias lácticas homofermentativas producen más diacetilo/acetoina a partir del piruvato que del citrato, iniciándose el proceso tan pronto como comienza el crecimiento de estos microorganismos. La producción máxima tiene lugar durante la fase exponencial de crecimiento, más tarde, y coincidiendo con la fase estacionaria, comienza su metabolización (El-Gendy y col., 1983). Los investigadores citados han observado que la producción de este metabolito depende de la cepa estudiada. Savoy de Giori y col. (1986) estudiaron en bacterias lácticas el efecto de la temperatura en la producción de diacetilo y observaron que era máxima a 15 °C. Ello podría explicar que no detectásemos estos metabolitos al final del desarrollo de las cepas estudiadas a las diversas temperaturas ensayadas, y que solo se detectasen transitoriamente a 15 °C durante el desarrollo de algunas de las cepas de *L. sake*.

V 6 - Identificación y curado de los alimentos de diversas cepas de *L. sake*

Hace un par de décadas se observó que en las bacterias lácticas algunas funciones metabólicas importantes eran inestables, lo que constituyó el

estimulo inicial para evaluar la presencia de elementos genéticos extracromosomiales en este grupo bacteriano. McKay y col. (1972) realizaron estudios pioneros en este campo al especular, primero, y demostrar, después, que la pérdida de la capacidad de fermentar la lactosa de algunas cepas de *L. lactis* se obtenía empleando técnicas de curación de plásmidos. Desde entonces los lactococos han sido las bacterias lácticas cuyas funciones metabólicas codificadas en plásmidos han sido mejor caracterizadas; hoy se sabe que muchas funciones metabólicas como la utilización de la lactosa, síntesis de proteasas, utilización de citrato y algunas otras más se encuentran codificadas en plásmidos (Batt, 1986). Algunas cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* y de *L. lactis* subsp. *cremoris*, contienen complementos plasmidicos grandes y complejos (Gasson y Davies, 1984), pudiendo poseer entre 2 y 11 plásmidos, aunque lo más frecuente es encontrar entre 4 y 7 (McKay, 1983).

En contraste con los numerosos estudios realizados con *Lactococcus* sp., el DNA plasmidico del género *Lactobacillus* no ha sido todavía bien caracterizado. Desde que Chassy y col. (1976) presentaron la primera evidencia de la presencia de plásmidos en *L. casei*, diversos grupos de investigadores han demostrado su existencia en otras especies y cepas del citado género (Chassy y col., 1978; Smiley y Fryder, 1978; Vescovo y col., 1982; Lin y Savage, 1986; Klaenhammer, 1984; Nes, 1984; Romero y McKay, 1985).

Mientras que un gran número de plásmidos de *Lactobacillus* sp. son crípticos (Batt, 1986), otros se han asociado a determinados fenotipos como al metabolismo de la lactosa en *L. casei* (Chassy y col., 1978), a la resistencia a los antibióticos en *L. acidophilus* y *L. reuteri* (Vescovo y col.,

1982), a la producción de ácido láctico y a la fermentación de la N-acetil-D-glucosamina en *L. helveticus* (Smiley y Fryder, 1978) y a la producción del enzima β -D-fosfogalactosido galactonidrolasa en *L. casei* (Lee y col., 1982). Recientemente se ha demostrado la codificación en plásmidos de la síntesis de tres bacteriocinas, una producida por *L. acidophilus* (Hurtado y Klaenhammer, 1987) y dos por *L. sake* (Schillinger y Lücke, 1989a; Mortvedt y Nes, 1990).

Con estos antecedentes, y debido tanto al deseo de elucidar el posible papel del DNA plasmídico en la producción de sustancias antimicrobianas por *L. sake* como al hecho de que los perfiles plasmídicos proporcionan valiosas "huellas dactilares" de cada cepa, muy útiles para investigar identidades y relaciones entre ellas (Davies y col., 1981), es por lo que decidimos visualizar la posible presencia de plásmidos en varias de nuestras cepas de *L. sake* aisladas de embutidos crudos curados.

Gran parte del éxito en el aislamiento e identificación de plásmidos recae en la elección de una metodología adecuada. Inicialmente, el DNA plasmídico de las bacterias lácticas se detectaba tras la centrifugación hasta el equilibrio en gradientes de cloruro de cesio-bromuro de etilo (CICs-BrEt) del DNA bacteriano marcado radiativamente (Cords y McKay, 1974). La microscopía electrónica de este DNA revelaba moléculas plasmídicas circulares, cuyo tamaño podía estimarse midiendo la extensión de su contorno (Cords y McKay, 1974; Chassy y col., 1976; Andersen y McKay, 1977).

Actualmente, la electroforesis en geles de agarosa constituye la técnica más adecuada y rápida para la visualización de plásmidos en las bacterias

lácticas (Klaenhammer y col., 1978). Sin embargo, en los procedimientos de detección de plásmidos, primero deben romperse las células y, posteriormente, extraer su DNA. Para conseguir estos objetivos se han utilizado varias técnicas que, a grandes rasgos, se dividen en dos grupos, métodos de lisado sencillo, en los que la membrana celular con el DNA cromosómico unido se precipita y extrae por centrifugación (Klaenhammer y col., 1978; Gasson y Davies, 1980b), y métodos que conllevan la desnaturalización del DNA cromosómico a pH alcalino (Currier y Nester, 1976; Walsh y McKay, 1981; Anderson y McKay, 1983). Los últimos son preferibles cuando se espera la presencia de plásmidos de gran tamaño molecular (Gasson y Davies, 1984). No obstante, actualmente es frecuente el empleo de técnicas mixtas que incluyen tanto la lisis celular como el tratamiento alcalino de los lisados resultantes (Klaenhammer, 1984).

También se han desarrollado otros protocolos racionalizados en estudios preliminares simultáneos de la visualización del DNA plasmídico de un gran número de cepas (Leblanc y Lee, 1979; Gasson, 1983; Anderson y McKay, 1983; Gasson, 1989). Estas técnicas son generalmente del tipo mixto.

Para la detección y visualización de plásmidos en cepas de *L. sake*, comparamos la eficacia de diversas técnicas, todas ellas mixtas: 1.) lisis celular por el método de Chassy (Chassy, 1976; Chassy y Giuffrida, 1980) seguida del aislamiento del DNA plasmídico, según la técnica de Currier y Nester (1976), 2.) igual que la anterior, pero seguida de la purificación del DNA plasmídico por centrifugación en gradientes de CICs-BrEt y 3.) técnica miniaturizada y rápida de aislamiento y visualización de plásmidos, desarrollada por Birnboim y Doly (1979) y modificada por Gasson (1989).

Todas ellas tienen en común la lisis inicial de las células con lisozima. Cuando las técnicas tradicionales de lisis y aislamiento del DNA plasmídico empezaron a aplicarse en los lactobacilos, se pensaba que los resultados negativos obtenidos se debían a su insensibilidad a la lisozima. Esto motivó que se desarrollasen otros métodos para optimizar la acción de dicho enzima, como el empleo de detergentes, entre los que destaca el dodecilo sulfato sódico (SDS) (Chasay y col., 1976). La lisis celular se consigue mediante la acción combinada de la lisozima, el polietilén glicol y el SDS, seguida de una incubación de las células durante una hora a 37 °C, para facilitar la digestión de la pared celular. Sin embargo, algunos investigadores (Klaenhammer, 1984) opinan que dicha incubación es innecesaria y que incluso va en detrimento del aislamiento de plásmidos en algunas especies de lactobacilos.

De los resultados obtenidos en la sección IV. 6, se desprende que con el primer método de aislamiento y visualización de plásmidos, las cepas de *L. sake* analizadas mostraban 1 ó 2 plásmidos de pequeño tamaño molecular. Cuando se realizó la purificación del DNA plasmídico a homogeneidad, mediante centrifugación de los lisados celulares en gradientes de ClCs-BrEt, los resultados fueron negativos. Sin embargo, utilizando la técnica miniaturizada y rápida se observaron 4 bandas plasmídicas en las cepas de *L. sake* 31 (fig. 4. 22), y 77 (fig. IV. 23) y 7 en la de *L. sake* 148 (fig. IV. 24).

Esta variación en el número de plásmidos detectables en una misma cepa, dependiente de la técnica de visualización empleada, ha sido observada por otros investigadores. Leblanc y Lee (1979) con un método miniaturizado y rápido de visualización de plásmidos demostraron la presencia de, al menos, un plásmido en diversos estreptococos de origen oral, que se creía que carecían de elementos extracromosomales al no haberse detectado en

estudios previos de centrifugación de lisados celulares en gradientes de densidad.

En nuestro caso, la técnica miniaturizada y rápida de visualización de plásmidos también es la más útil, rápida y reproducible en las cepas de *L. sakei* analizadas. Las técnicas que emplean centrifugaciones en gradientes de densidad son incómodas, caras y requieren mucho tiempo, lo que las convierte en poco prácticas, especialmente en estudios preliminares (Leblanc y Lee, 1979). Otro inconveniente es la pérdida de los plásmidos durante la extracción del DNA bacteriano, sobre todo si son de pequeño tamaño. Los últimos avances en las técnicas de biología molecular han hecho innecesario, en muchos casos, la purificación a homogeneidad del DNA plasmídico, que puede escindirse con endonucleasas de restricción, transformarse e incluso secuenciar a partir de preparados menos purificados procedentes de pequeños volúmenes de cultivos (Maniatis y col., 1982).

Tras visualizar la presencia de plásmidos en algunas de las cepas de *L. sakei* analizadas, se realizaron con ellas experimentos de curado, para elucidar si su capacidad de producir sustancias antimicrobianas estaba codificada en alguno de ellos.

El curado de los plásmidos puede conseguirse mediante el empleo de dosis subinhibidoras de ciertas sustancias, como el bromuro de etidio, naranja de acridina, novobiocina y, especialmente, acriflavina, o mediante la incubación de las cepas a analizar a temperaturas de crecimiento superiores a la óptima. Por lo que respecta a trabajos realizados con lactobacilos, Muriana y Kleenhammer (1967) fracasaron al intentar obtener variantes de *L. acidophilus* 88 no productoras de lactacina F mediante la acción de

sustancias químicas. Sin embargo, 4 cepas de las 3848 analizadas, si perdieron tal propiedad tras incubaciones sucesivas de sus cultivos a 37 y 43 °C.

En cambio, Schillinger y Lücke (1989a) no consiguieron variantes que no sintetizasen sakacina A (sak⁺) a partir de cultivos de *L. sake* crecidas a 37 °C, temperatura superior a la óptima. Sin embargo, tras tres tratamientos consecutivos de los cultivos con acriflavina, obtuvieron 11 y 8 variantes sak⁺ de las 256 colonias analizadas, de *L. sake* Lb706 y de las 356 de *L. sake* Lb796.

Dado que nuestras cepas de *L. sake* son de origen cárnico, elegimos la acriflavina como agente curante, comprobando que sus dosis inhibitorias (Tabla IV. 16) coincidían con las obtenidas por Schillinger y Lücke (1989a) para las suyas. Tras los tres tratamientos con acriflavina, el número de colonias sin actividad inhibitoria, procedentes de 300 colonias analizadas de cada cepa osciló, según las cepas, entre 14 y 50 (Tabla IV. 17), resultados similares también, aunque ligeramente superiores, a los de Schillinger y Lücke (1989a).

De las colonias curadas carentes de actividad antimicrobiana, se seleccionaron 5 procedentes de las cepas de *L. sake* 31, 77 y 148, que se sometieron a la visualización de su DNA plasmídico empleando la técnica miniaturizada y rápida de aislamiento e identificación de plásmidos. El examen de los geles correspondientes a las cepas 31 y 77 revela el mismo número de bandas plasmídicas en las colonias curadas que en las originales (figuras 4. 22 y 4. 23); por lo que respecta a la cepa 148 (figura 4. 24), en las muestras de las colonias curadas parece faltar, al menos, una de las tres

bandas de DNA plasmídico de mayor tamaño molecular, no observándose en dos de ellas las dos bandas de menor tamaño

De los resultados obtenidos se deduce que las cepas de *L. sake* analizadas poseen plásmidos de diverso tamaño molecular, sin que se haya profundizado, de momento, lo suficiente para determinar si la síntesis de las sustancias inhibidoras de naturaleza proteica se encuentra vinculada a alguno de ellos.

No obstante, se sabe que en algunas cepas de *Lactococcus* sp. la síntesis de bacteriocinas se encuentra codificada en plásmidos de un tamaño molecular variable (Dobrzanski y col., 1982; Neve y col., 1984). Por lo que respecta a la misma (la bacteriocina mejor caracterizada), a pesar de que existen pruebas genéticas claras de que los genes de producción de la misma/fermentación de la sacarosa están codificados en plásmidos, tal molécula plasmídica no se ha identificado convincentemente (Gasson y Davies, 1984).

La codificación de la síntesis de bacteriocinas en plásmidos es un hecho demostrado, asimismo, en *P. pentosaceus* (Daeschel y Klaenhammer, 1985) y *P. acidilactici* (González y Kunka, 1987; Ray y col., 1989).

Las investigaciones sobre los plásmidos que codifican la producción de bacteriocinas en lactobacilos han sido históricamente infructuosas (Upreti y Himechil, 1973; Barefoot y Klaenhammer, 1983; Joerger y Klaenhammer, 1985; Daeschel y col., 1990). La identificación de dos plásmidos relacionados con la síntesis de lactacina F en transconjugantes de *L. acidophilus* 88 (Murlana y Klaenhammer, 1987), constituyó la primera evidencia de que los plásmidos de

los lactobacilos pueden jugar un papel importante en los fenómenos de transferencia genética y de producción de proteínas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos.

Recientemente, y por lo que se refiere a los lactobacilos de origen cárnico, Schilling y Lucke (1989a) y Mortvedt y Nes (1990), han puesto de manifiesto en diversas cepas de *L. sake* el posible papel jugado por el DNA plasmídico como responsable de la producción de bacteriocinas.

Sin embargo, como ya se ha señalado antes, en este trabajo no se ha podido dilucidar el papel de los plásmidos de las cepas de *L. sake* seleccionadas en la síntesis de sustancias antimicrobianas, aunque sospechamos que dicha relación es importante y su evaluación definitiva constituye uno de nuestros objetivos más importantes.

V 7. - Actividad inhibidora de los cultivos mixtos de *L. sake* 2J y *L. sake* 148 con microorganismos psicrótrofos productores de toxinfeciones alimentarias.

El almacenamiento de los alimentos a temperaturas de refrigeración impide o retrasa el desarrollo de los microorganismos que contienen. Las temperaturas de refrigeración reducen o impiden la síntesis de diversos metabolitos finales producidos por los microorganismos alterantes e impiden o disminuyen mucho la síntesis de toxinas de los microorganismos patógenos (Palumbo, 1986).

Sin embargo, durante los últimos años ciertas bacterias psicrótrofas patógenas, conocidas desde hace tiempo, han adquirido una gran importancia

en la industria alimentaria. Ello se ha debido a que tanto la mejora de los métodos de aislamiento e identificación, como los estudios epidemiológicos sistemáticos, han permitido reconocer su verdadero potencial patógeno y sus vinculaciones ecológicas (Orth y Mrozek, 1989). De otra parte, el amplio empleo de la refrigeración en la conservación de los alimentos, resultante en gran parte de la creciente demanda de alimentos precocinados y de rápida preparación, actúa seleccionando los microorganismos que contienen, facilitando el desarrollo de los psicrotrofos. Los microorganismos psicrotrofos son, por definición, aquellos que se desarrollan a temperaturas de refrigeración, independientemente de su temperatura óptima de crecimiento (Eddy, 1960).

Entre los microorganismos psicrotrofos patógenos se encuentran *C. botulinum* tipo E, *Y. enterocolitica* y *List. monocytogenes*. No obstante, tampoco conviene olvidar aquellas bacterias no psicrotrofas, que sobreviven durante largos periodos de tiempo a temperaturas de refrigeración (*C. jejuni* y *Brucella* sp.), ni las que se desarrollan a temperaturas ligeramente superiores a las últimas (*S. aureus*, *Salmonella* sp., *Vibrio parahaemolyticus*, *A. aerius*, etc.), de ahí los riesgos derivados del empleo de temperaturas inadecuadas (Palumbo, 1986).

Aunque, la refrigeración de los alimentos no garantiza, por sí sola, la ausencia de riesgos microbianos, la seguridad de los alimentos refrigerados puede ampliarse cuando la refrigeración se emplea conjuntamente con otros factores o "barreras microbianas" (Hoberg, 1989).

Leistner y Rodet (1976) introdujeron el término "barreras u obstáculos microbianos", para definir aquellas situaciones en las que el empleo de una

sustancia química o factor físico, a una concentración o intensidad que por sí misma no produce una inhibición total, protege eficazmente los alimentos en presencia de otros factores limitantes, a niveles también subinhibidores. Es decir, la combinación de factores inhibidores puede tener como consecuencia una mejora considerable en la estabilidad de los alimentos, ya que los microorganismos para desarrollarse deben superar, teóricamente, todas las barreras impuestas (Scott, 1989). Estas barreras incluyen, entre otras, la acidificación con un descenso del pH, el control de la humedad o de la Aw, la presencia de microflora competitiva, la utilización de conservadores y los tratamientos térmicos altos (Mcberg, 1989).

Las bacterias lácticas son microorganismos ampliamente empleados en la conservación de los alimentos (Bacus y Brown, 1981; Smith y Palumbo, 1983; Gibbs, 1987), debido especialmente a su capacidad de elaborar sustancias antimicrobianas (Daeschel, 1989). En este contexto, nuestro objetivo ha sido evaluar la capacidad de 2 cepas de *L. sake* para inhibir, tanto a temperaturas de refrigeración como superiores, el desarrollo de *Enterococcus* y *List. monocytogenes* microorganismos psicrotrofos patógenos de gran interés en la industria cárnica (Orth y Mrozek, 1989; Raccach y Henningsen, 1984; Johnson y col., 1990).

Un factor de gran importancia es que las bacterias lácticas sean, asimismo, capaces de desarrollarse a temperaturas de refrigeración. Gilliland y Speck (1975) evaluaron la posibilidad de emplear cultivos iniciadores selectos (formados por cepas de *L. bulgaricus* no psicrotrofos) para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas* sp. en alimentos refrigerados, observando su absoluta incapacidad para cumplir tal función. Champagne y col. (1990) realizaron estudios similares con cepas mesófilas de *Lactococcus* sp. en

leche refrigerada. Estas cepas eran recomendadas por los distribuidores comerciales por su actividad inhibidora de las bacterias psicrotrofas de la leche; sin embargo, no se desarrollaron bien a 7 °C, produciendo cantidades mínimas de ácido láctico y dando lugar a que en los análisis estadísticos no se encontrasen diferencias significativas en el crecimiento de los microorganismos psicrotrofos de la leche, con o sin cultivo iniciador. No obstante, Abdel-Bar y Harris (1984) han obtenido resultados más alentadores utilizando cepas psicrotrofas de *L. bulgaricus* para inhibir el desarrollo de *Pseudomonas* sp. En este sentido, tanto *L. sake* 23 (Tabla IV. 6) como *L. sake* 148 (Rodríguez y col., 1989) han demostrado ser inequívocamente psicrotrofas.

V. 2. 1 - Inhibición de *Yersinia enterocolitica*

Y. enterocolitica es un microorganismo ampliamente distribuido en el medio ambiente e implicado en la patogenia de una variedad de cuadros clínicos que afectan a la especie humana (Swaminathan y col., 1982).

De los animales de abasto, los cerdos se consideran como el mayor reservorio de serotipos de *Y. enterocolitica* implicados en infecciones humanas, entre los que se incluyen el O:3, O:8 y O:9 (Bermúdez y col., 1989; Kleenle y Untermann, 1990). La carne de cerdo, sola o en combinación con la de otras especies, es un ingrediente esencial en la formulación de embutidos; puesto que ciertos tipos de embutidos no se someten a la acción del calor, su estabilidad y seguridad microbiológica depende de los agentes antimicrobianos añadidos o formados en el producto (Raccach y Henningsen, 1984).

Se sabe, desde hace tiempo, que en los cultivos de *X. enterocolitica* la flora competitiva ejerce un gran efecto en su desarrollo. Schlemann y Olson (1984) observaron que la incapacidad de *X. enterocolitica* de alcanzar un desarrollo máximo en cultivos mixtos con otras bacterias Gram-negativas, se debía a un fenómeno denominado de "masificación metabólica" y no a un agotamiento de nutrientes esenciales o a un cambio desfavorable del pH, de la tensión de oxígeno o de la síntesis de metabolitos tóxicos. Kleinlein y Untermann (1990), han señalado que los niveles altos de flora competitiva, esencialmente *Pseudomonas* sp. y enterobacterias, en la carne picada fresca impiden la detección de *X. enterocolitica* a los 5 días de conservación a 16 °C. A 4 °C, la misma flora competitiva lograba que al final de la incubación la población de *X. enterocolitica* no fuera mayor de 1×10^4 ufc/g.

En los dos casos, la flora microbiana competitiva era mayor de 1×10^5 ufc/g y la de *X. enterocolitica* de unas 1×10^3 ufc/g. No obstante, los cultivos de *X. enterocolitica* con niveles bajos de flora competitiva (1×10^2 ufc/g) alcanzaban niveles de 1×10^7 y de 1×10^8 ufc/g a 4 y 16 °C, respectivamente. Fukushima y Gomyoda (1986) han observado que el desarrollo de *X. enterocolitica* del serotipo O:3, en cultivos mixtos con otros microorganismos que se encuentran en menor número, no difiere del control; sin embargo el desarrollo de *X. enterocolitica* O:3 fracasaba, tanto a 4 como a 26 °C, en aquellos cultivos mixtos cuyos inóculos eran superiores al suyo.

Los estudios citados se han basado en cultivos mixtos de *X. enterocolitica* y otras bacterias Gram negativas. El potencial de las bacterias lácticas para controlar el desarrollo de *X. enterocolitica* ha sido analizado por otros investigadores. Así Raccach y Henningsen (1984) han observado que tanto *P. pentosaceus* como *P. acidilactici* y *L. plantarum*,

pueden emplearse para prevenir el desarrollo de *K. enterocolitica* en la carne y productos cárnicos. En sus experiencias, la inhibición de *K. enterocolitica* fue manifiesta, cuando no total, a 27 y 35 °C. Nielsen y Zeuthen (1985) observaron que el muy rápido desarrollo de *K. enterocolitica* 0:3 y 0:9, en cultivos puros, era inhibido completamente en los productos cárnicos envasados al vacío, inoculados con lactobacilos.

Chavarri (1987), al evaluar en leche pasteurizada de vaca la inhibición por bacterias lácticas de diversos microorganismos patógenos psicrótrofos, observó que, de todos los estudiados, *K. enterocolitica* era el más sensible a la adición a la leche de un cultivo láctico iniciador. De manera similar a lo observado en nuestras experiencias, este investigador no detectó la presencia de *K. enterocolitica* en la leche mantenida durante 72 h. a 16 °C, mientras que en la leche sin adición de cultivos lácticos, *K. enterocolitica* alcanzaba, en el mismo período de tiempo, casi 1×10^9 ufc/ml.

Recientemente, Nout y col. (1989) han observado que la fermentación de alimentos infantiles por bacterias lácticas, presentes en ellos de forma natural, inhibía completamente el desarrollo de *K. enterocolitica*.

Los resultados de este trabajo demuestran que las tres cepas de *K. enterocolitica* utilizadas, son inhibidas por *L. sake* (Tablas IV. 18 y IV. 20; figuras 4. 25 y 4. 26), observándose en las experiencias realizadas a distintas temperaturas de incubación, una correlación positiva entre el número de células de *L. sake* de los cultivos, el descenso del pH y la concentración de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico. La inhibición es más eficaz cuando se emplean las temperaturas de incubación más elevadas y el microorganismo utilizado es *L. sake* 23 en vez de *L. sake* 148. *K. enterocolitica* 14405 fue la

cepa más resistente a la inhibición por *L. sake*.

La producción de ácido láctico y el consiguiente descenso del pH son, probablemente, los factores que más influyen en el efecto inhibitor de las cepas de *L. sake* en *K. enterocolitica*. Esto explicaría la mayor inhibición de *L. sake* 23 en las cepas de *K. enterocolitica* evaluadas, experimentalmente se ha determinado que esta cepa produce más ácido láctico que la de *L. sake* 148 (Tabla IV 19). Aunque *L. sake* 148 produce una sustancia antimicrobiana extracelular de naturaleza proteica, esta no es activa frente a *K. enterocolitica* (Rodríguez y col., 1989). El papel del ácido láctico en la inhibición de *K. enterocolitica* se ve reforzado por el hecho de que, independientemente de la temperatura de incubación, los niveles de *K. enterocolitica* declinaban cuando los niveles de ácido láctico producidos por las cepas de *L. sake* empezaban a ser detectables.

K. enterocolitica es un microorganismo que no tolera valores de pH muy ácidos, siendo necesario para su desarrollo valores de pH superiores a 4,6 (Hanna, 1977). Asimismo, cuando el pH del medio es de 5,2 - 5,5, *K. enterocolitica* se desarrolla lentamente a 4 °C (Seelye y Yearbury, 1979). Ahmed y col. (1986) al evaluar el desarrollo y supervivencia de *K. enterocolitica* en el yogur, señalaron que la producción rápida de ácido láctico por los cultivos iniciadores y el empleo de leche de buena calidad son esenciales para inhibir el crecimiento de las yersinias en dicho producto lácteo. Schillingher y Lucke (1989b) demostraron que la inhibición de *Salmonella* sp. por *L. sake* en embutidos crudos curados, se debía exclusivamente a la producción de ácido láctico por la bacteria láctica evaluada.

De los resultados obtenidos se deduce que las cepas de *L. sake* analizadas ejercen una acción inhibitoria detectable y cuantificable en el desarrollo de *V. enterocolitica* en medios de cultivo líquidos y a diversas temperaturas. En consecuencia, y conociendo que las dosis infectivas de *V. enterocolitica* en personas adultas sanas son muy elevadas, del orden de 1×10^8 ufc/g (Szita y col., 1973), las cepas de *L. sake* evaluadas podrían ser "factores de seguridad" útiles para inhibir el desarrollo de *V. enterocolitica* en las carnes refrigeradas y en diversos productos cárnicos.

V 7.2 - Inhibición de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un microorganismo Gram-positivo, potencialmente patógeno para los animales y el hombre, particularmente en algunos grupos de alto riesgo como los recién nacidos, mujeres gestantes, alcohólicos, diabéticos, individuos sometidos a hemodiálisis e inmunodeficientes por tratamientos de quimioterapia o corticoterapia (Farrag y North, 1989). En estos grupos, la infección bacteriana que cursa con meningitis, septicemias y abortos, se asocia a una elevada mortalidad, alrededor del 30 % (Farber, 1989). Las personas sanas, sin enfermedades subyacentes, son relativamente resistentes a esta enfermedad.

Se ha comprobado en los últimos años que diversos brotes de listeriosis se encontraban asociados al consumo de alimentos contaminados, lo que ha originado una profunda preocupación en la industria alimentaria (George y col., 1988). Actualmente se sabe que la carne y los productos cárnicos son portadores de cepas patógenas de *List. monocytogenes* (Johnson y col., 1990), lo que unido a su carácter psicrotrofo, lo convierte en un microorganismo cuya presencia o desarrollo conviene eliminar o reducir de los sustratos

alimenticios citados la utilización de bacterias lácticas o de bacteriocinas, que eliminen o reduzcan la presencia de este microorganismo, puede constituir una medida de control adecuada en los alimentos (Farber, 1989, Rodríguez y col., 1989)

Se sabe que el efecto bacteriostático de las bacterias lácticas frente a *List. monocytogenes* constituye posiblemente una situación bastante común. Raccach y col. (1989) han señalado el efecto bacteriostático y, en sólo algunos casos, bactericida que *L. acidophilus* ejerce en *List. monocytogenes*, mientras que Buchanan y col (1987), Johnson y col. (1988a) y Shalef (1989), citan la persistencia, pero no el desarrollo, de *List. monocytogenes* en carne fresca picada de bóvido y en carne y productos cárnicos de pollo en presencia de una flora láctica competitiva. Johnson y col (1988b) han observado que *List. monocytogenes* no se desarrolla durante la maduración de los embutidos elaborados con carne de bóvido.

Los resultados de esta tesis indican que las tres cepas de *List. monocytogenes* analizadas son más resistentes a la acción antagonista de *L. sake* que las de *V. enterocolitica* (Tablas IV 21 y IV 23, figuras 4 27 y 4 28). No obstante, las tres son inhibidas cuando se cultivan con cualquiera de las dos cepas de *L. sake*. *List. monocytogenes* NTCT7073 es la cepa más sensible, mientras que el comportamiento frente a los lactobacilos de las otras dos cepas es muy parecido.

De los resultados obtenidos se deduce que el nivel máximo de *List. monocytogenes* en los cultivos mixtos, a cualquier temperatura, inicia su declive cuando comienza a ser apreciable la producción de ácido láctico. Asimismo, y a diferencia de lo que ocurría en los cultivos con *V*

enterocutánea la inhibición originada por *L. sake* 148 es similar a la de *L. sake* 23, a pesar de que la producción de ácido láctico por el primero sigue siendo ligeramente menor. Esta situación podría explicarse por el efecto inhibitor adicional de la sustancia antimicrobiana exocelular de naturaleza proteica producida por *L. sake* 148 (Sobrino y col., 1991), a la que se sabe que es sensible *List. monocytogenes* (Rodríguez y col., 1989). La producción de sustancias antimicrobianas exocelulares comienza a apreciarse a finales de la fase exponencial del desarrollo de los microorganismos productores o al inicio de la estacionaria. En nuestro caso, estas fases coinciden con el declive del crecimiento de *List. monocytogenes* o con su fase estacionaria.

Han sido varios los investigadores que han observado el efecto inhibitor de los ácidos orgánicos en *List. monocytogenes*. Ya en 1966, Gray y Killinger sugirieron que un pH menor de 5,0 inhibía el desarrollo de *List. monocytogenes*. George y col. (1988) utilizando como acidulante el ácido clorhídrico demostraron que este microorganismo iniciaba su desarrollo a valores de pH de 4,39 a 4 °C y de 5,23 a 30 °C. Sin embargo, admiten que en muchos alimentos cuyo pH es bajo debido a la presencia ácidos como el láctico o el acético, los valores de pH limitantes para el desarrollo de *List. monocytogenes* podrían ser significativamente mayores que los citados.

Los estudios realizados hasta 1988 sobre el efecto del pH en el desarrollo de *List. monocytogenes* se han realizado empleando para ajustar el pH del medio ácido clorhídrico. Sin embargo, ciertos ácidos orgánicos, como el láctico y el acético, se han empleado tradicionalmente para incrementar la vida útil y mejorar la seguridad microbiológica de los alimentos. En este sentido, Farber y col. (1989) han investigado el efecto de varios ácidos en el desarrollo de *List. monocytogenes* observando que el pH mínimo para su

crecimiento en caldo BHI oscilaba entre 5,0 y 5,5 a 4 °C, y entre 4,9 y 5,1 a 30 °C. Sorrells y col (1989), han sugerido que la inhibición de *List monocytogenes* depende del ácido empleado y de la temperatura de incubación. Los mismos autores concluyeron que la actividad antimicrobiana global del ácido láctico es mayor que la de los ácidos cítrico, málico y clorhídrico, e igual o ligeramente menor que la del ácido acético. Asimismo, observaron que, independientemente de la temperatura, el pH que impedía el desarrollo de *List monocytogenes* era, para el ácido láctico, de 4,4-4,6.

Ahamad y Marth (1990) opinan que los conservadores ácidos sirven, a menudo, más como inhibidores del desarrollo microbiano que como agentes letales. Sin embargo, añaden que es probable que la exposición de *List monocytogenes* a concentraciones altas de ácidos le produzcan lesiones celulares permanentes. El papel de la acidez en la inhibición de *List monocytogenes*, se ve reforzado por el hecho de que el consumo de antiácidos en pacientes con trastornos gástricos, está considerado como un factor que contribuye a la adquisición de la infección listeriosa (Farber, 1989).

Farber y col. (1988) no consideran fácil el hacer afirmaciones definitivas sobre el efecto que los cultivos iniciadores ejercen en la presencia de *List monocytogenes* en los productos cárnicos curados, debido a que en sus experiencias, en las muestras en las que se detectaban listerias inicialmente, pero no en el producto final, cinco de ellas se elaboraron con un cultivo iniciador y otras cinco sin el mismo. Del mismo modo, de las muestras que contenían *List monocytogenes* en el producto final, dos se elaboraron con un cultivo iniciador y tres sin él. Farrag y Marth (1989), sugieren que *List monocytogenes* se desarrolla en presencia de otras bacterias psicrótrofas, como *Pseudomonas* sp., presentes en la leche. En sus experiencias, el

desarrollo de estas últimas tampoco se vió afectado por la presencia de *List. monocytogenes*. Johnson y col. (1990), afirman que el ácido producido por los cultivos iniciadores es un factor importante en la inhibición del desarrollo de *List. monocytogenes*.

Asimismo, la clasificación taxonómica de *List. monocytogenes* ha sido tradicionalmente confusa. En 1977, Wilkinson y Jones realizaron un estudio taxonómico de *Listeria* y recomendaron su inclusión en la familia *Lactobacillaceae*. Las bacteriocinas, moléculas proteicas con actividad antimicrobiana, poseen generalmente un espectro de acción limitado a especies y cepas estrechamente relacionadas con la productora, por lo que la relación anteriormente citada sugiere la posibilidad de que las bacteriocinas, o sustancias similares, producidas por las bacterias lácticas podrían inhibir el desarrollo de *List. monocytogenes* (Harris y col., 1989; Rodríguez y col., 1989). En este sentido se han realizado recientemente diversos estudios, que han demostrado la inhibición de *List. monocytogenes* por bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* (Carminati y col., 1989), *P. acidilactici* (Smeyers y col., 1988; Pucci y col., 1988; Nielsen y col., 1990), *P. pentosaceus* (Harris y col., 1989), *L. sake* (Schillinger y Lucke, 1989a; Rodríguez y col., 1989; Sobrino y col., 1991) y *C. piscicola* (Ann y Stiles, 1990b). De esta manera, el empleo de bacterias lácticas bacteriocinogénicas, como cultivos iniciadores, o de las bacteriocinas que producen como aditivos alimentarios, especialmente en alimentos no fermentados, puede constituir un sistema eficaz de controlar la presencia de *List. monocytogenes* en los alimentos (Harris, 1989; Rodríguez y col., 1989). A este respecto, se sabe que *L. sake* 548 produce una sustancia similar a las bacteriocinas con efecto bacteriostático en *List. monocytogenes* (Sobrino y col., 1991).

Para el control de *List. monocytogenes* en los alimentos quizá convenga recordar que es un microorganismo ampliamente distribuido en la naturaleza, pudiéndose encontrar en el suelo, agua, vegetación, alimentos, en los animales y en las personas. Puede crecer en un amplio intervalo de temperaturas, incluidas las de refrigeración, y permanece durante mucho tiempo viable a temperaturas de congelación. Se desarrolla en un amplio intervalo de pH y aún es mayor el margen en el que sobrevive. Crece a Aw inadecuadas para otras bacterias y se sitúa entre las formas vegetativas bacterianas más termorresistentes (Lovett, 1989). Todo ello indica que en el control de la presencia de este microorganismo patógeno en los alimentos, es conveniente recurrir a la interacción de diversos factores.

El desarrollo de los microorganismos en la carne y productos cárnicos, se encuentra controlado por la interacción de diversos parámetros nutricionales y ambientales, entre los que se incluyen la temperatura, pH, contenido de oxígeno, concentración de sal y/o de nitrito sódico, etc. (Buchanan, 1986). Shahamat y col. (1980) observaron que la eficacia del nitrito sódico en el control de *List. monocytogenes* dependía, además de la temperatura, del pH y del contenido de cloruro sódico. Los mismos autores concluyeron que el nitrito sódico, a los niveles permitidos en los productos cárnicos, únicamente mostraría una actividad inhibidora significativa en productos refrigerados con, al menos, un 3 % de sal y un pH de 5,5 o menor. Buchanan y col. (1989) han observado que la cinética del desarrollo de *List. monocytogenes* Scott A en un medio líquido definido depende, particularmente en lo que respecta al desarrollo exponencial y a la duración de la fase de latencia, de la interacción de cinco variables: temperatura y pH inicial, tipo de atmósfera, contenido en cloruro sódico y concentración de nitrito sódico. Los mismos datos sugieren que el nitrito sódico posee una

acción bacteriostática significativa frente a *List. monocytogenes* y proporciona a las carnes curadas un alto grado de protección frente a este microorganismo, especialmente si se emplea conjuntamente con una combinación de pH ácido, una concentración elevada de cloruro sódico y una refrigeración adecuada.

Los resultados de nuestro trabajo indican que las cepas de *L. sake* analizadas pueden contribuir, junto con otros factores, a mejorar el control de *List. monocytogenes* en la carne y productos cárnicos.

V. 8. - Caracterización y purificación parcial de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449

Los resultados del efecto de diversos enzimas proteolíticos en la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, se muestran en la Tabla IV. 25; diversos enzimas proteolíticos anulan la actividad inhibidora exocelular de la cepa analizada, de donde se deduce que la sustancia antimicrobiana posee una estructura proteica. Asimismo, los resultados que se muestran en la figura 4. 29 permiten establecer los parámetros cinéticos de termodestrucción de la actividad antimicrobiana referida; de ellos se deduce la excelente termorresistencia de esta cepa.

Uno de los criterios básicos para que una sustancia antimicrobiana se considere una bacteriocina es la existencia de un componente proteico biológicamente activo (Tagg y col., 1976), lo que se pone de manifiesto por su sensibilidad a los enzimas proteolíticos. Asimismo, al igual que las bacteriocinas producidas por *L. fermentum* 466 (DeKlerk y Smit, 1967), *L. helveticus* LP27 (Upreti y Hinsdill, 1973), *L. acidophilus* N2 (Barefoot y

Klaenhammer, 1983), *L. acidophilus* 88 (Muriana y Klaenhammer, 1988), *L. sake* L8706 (Schlenger y Lucke, 1989a), *L. plantarum* C-11 (Doesehel y col., 1990), *L. sake* L45 (Mortvedt y Nes, 1990), *L. brevis* B37 (Rammelsberg y Radler, 1990) y *C. piscicola* LV17 (Ahn y Stiles, 1990b), la sustancia antimicrobiana producida por *L. sake* 449 es termorresistente. No obstante, también se han descrito bacteriocinas termolabiles, como la helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1985) y la caseicina 80 (Rammelsberg y Radler, 1990).

Los resultados de la Tabla IV. 26 indican que la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 449 posee una acción bacteriostática definida, al menos, sobre *L. fermentum* CECT205. Las bacteriocinas son, por definición, proteínas o complejos proteicos con actividad bactericida (Tagg y col., 1976, Klaenhammer, 1988). Por lo tanto, la actividad bacteriostática de la sustancia antagonista de *L. sake* 449 la convierte estrictamente en una sustancia similar a las bacteriocinas. No obstante, la lactocina 27, sustancia antimicrobiana de *L. helveticus* LP27 (Joerger y Klaenhammer, 1985) se ha considerado, desde su caracterización, como una auténtica bacteriocina, a pesar de su actividad bacteriostática. Recientemente, Ahn y Stiles (1990a) han determinado que el mecanismo de acción de la sustancia antimicrobiana de *Lactobacillus* sp. UAL11 también es bacteriostática.

Una vez caracterizada parcialmente la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, el siguiente paso fué intentar su purificación, con el fin de separar la entidad activa de otros productos o restos celulares y de las proteínas del medio de cultivo. Hay que reconocer que el medio complejo MRS no es el más indicado para el desarrollo de *L. sake* 449, ya que los sobrenadantes que se obtienen contienen una concentración excesiva de

proteínas y peptidos (Barefoot y Klaenhammer, 1984), lo que no sucede con el medio mínimo de triptona, que siendo un medio semidefinido permite la síntesis de la sustancia antagonista de *L. sake* 449 (figura 4. 30). Debido a que las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de sustancias, los protocolos de purificación se han diseñado de forma empírica para cada una. A menudo, las preparaciones se concentran por precipitación con ácidos, sales o solventes orgánicos o por liofilización.

Barefoot y Klaenhammer (1984), tras emplear sin éxito la cromatografía de intercambio iónico, purificaron la lactacina B creando condiciones disociantes (Urea 8 M) antes de su ultracentrifugación y de someterla a la cromatografía de filtración en geles; utilizando esta última técnica se vio que el peso molecular de la sustancia parcialmente purificada era de 6.500 daltons. Sin embargo, cuando se realizó una electroforesis de la lactacina B purificada en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) no se apreciaron bandas en los geles, a pesar de teñirlos con reactivos de plata que son muy sensibles a la visualización de bandas proteicas en los geles. Dos años más tarde, Joerger y Klaenhammer (1986) purificaron la helveticina J, también mediante cromatografía de filtración en geles, empleando dodecil sulfato sódico (SDS) como agente disociante. El peso molecular de la bacteriocina purificada resultó ser de unos 37.000 daltons.

De otra parte, Rammelsberg y Radler (1990) han encontrado grandes dificultades al intentar purificar la brevicina 37 y la caseicina 80, utilizando los procedimientos de purificación proteica tradicionalmente empleados. Los mismos autores han observado, asimismo, que la concentración por liofilización de los sobrenadantes origina una pérdida importante de la actividad antimicrobiana.

En contraste con la utilización de las técnicas cromatográficas de filtración en geles, empleadas en la purificación de bacteriocinas de los lactobacilos, la purificación de la pediocina PA-1 (González y Kunka, 1987) y de la ACh (Bhunia y col., 1988), producidas por pediococos, se han realizado por cromatografía de intercambio iónico. El peso molecular de la pediocina PA-1 (16.500 daltons) se determinó por cromatografía de filtración en geles, mientras que el de la pediocina ACh (2.700 daltons) se estimó por electroforesis en geles de poliacrilamida.

En nuestro trabajo, la purificación de la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, se realizó concentrando los sobrenadantes por liofilización y separando las proteínas por cromatografía de filtración en geles, utilizando, asimismo, un agente disociante como la urea (a una concentración 6 M) para separar los agregados proteicos de la sustancia antimicrobiana descrita (figuras 4.31 a 4.33). El proceso de purificación se tradujo en un incremento poco apreciable de la actividad inhibidora específica y en una recuperación muy pequeña de la actividad inhibidora original (Tabla IV. 27). Los resultados obtenidos reafirman la observación de que las bacteriocinas son, a veces, recalcitrantes a su purificación empleando técnicas estandarizadas de separación (Rammelsberg y Radler, 1990). También es posible que la liofilización, realizada antes de las cromatografías de filtración, afecte negativamente a esta actividad antimicrobiana.

La pérdida de actividad, a menudo masiva, que se produce durante la purificación de las bacteriocinas, constituye un problema común en las bacterias lácticas (Tagg y col., 1976). Barefoot y Klaenhammer (1984) y Joerger y Klaenhammer (1986), únicamente lograron recuperar un 0,4 % de la

actividad inhibidora inicial de la lactacina B y un 4 % de la helveticina J. Sin embargo, mientras que la purificación final de la lactacina B fué de 3.222 la original y la de la helveticina J de 837 veces, la purificación final de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 449 es mucho menor. De ello se deduce que el método de purificación que hemos empleado no es el más eficaz por lo que conviene desarrollar otros que lo sean más.

El análisis de la sustancia antimicrobiana purificada de *L. sake* 449 por cromatografía de filtración reveló que la fracción activa posee un peso molecular de 30.979 daltons. Su electroforesis en geles de poliácridamida con dodecil sulfato sódico, realizada según el método de Swank y Munkres (1971), indicó que la fracción activa debía poseer un tamaño molecular de más de 16.900 daltons, sin que se detectase ninguna banda proteica de un peso molecular menor (figura 4. 34). La electroforesis de la misma actividad, realizada según el método de Laemmli (1970) y tiñendo los geles con un reactivo de plata, demostraron la existencia en la fracción activa de una banda protéica de un peso molecular aparente de 31.346 daltons (figura 4. 35), que coincide con el resultado del análisis cromatográfico de dicha actividad.

La tendencia de la sustancia antimicrobiana de *L. sake* 449 a formar agregados proteicos de un tamaño molecular variable es similar al de la lactocina 27 (Upreti y Hinsdill, 1973), lactacina B (Barefoot y Klaenhammer, 1984), helveticina J (Joerger y Klaenhammer, 1986), lactacina F (Muriana y Klaenhammer, 1991) y propionicina PL6-1 (Lyon y Glatz, 1991), que se aislaron primero como agregados proteico-polisacáridos complejos (partículas globulares parecidas a las micelas) o como agregados proteicos grandes, que más tarde se resolvieron utilizando diversas técnicas analíticas

o por electroforesis en geles de poliacrilamida.

La sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, ha mostrado su actividad inhibidora frente a bacterias patógenas Gram-positivas de gran interés en la industria alimentaria (Tabla IV. 28). La concentración inhibidora mínima de la sustancia purificada en los diversos microorganismos evaluados oscila entre 1 y 4 mg/ml, siendo la cepa de *S. aureus* FA1349 y *C. perfringens* 376 las más resistentes a la acción inhibidora de la misma. Los resultados obtenidos permiten hipotetizar, una vez más, sobre la posible utilidad de las bacterias lácticas y de sus bacteriocinas, como factores de seguridad en la carne y productos cárnicos.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

1) El análisis microbiológico de los embutidos crudos curados analizados, ha revelado que prácticamente la totalidad de su flora bacteriana está constituida por bacterias lácticas. Las 50 bacterias lácticas seleccionadas en primer lugar, manifestaron una actividad inhibidora directa variable y cuantificable frente a diversos microorganismos indicadores. De ellas se seleccionaron las 6 cepas que presentaron la máxima actividad inhibidora en el mayor número de microorganismos indicadores. A ellas se sumó la que llamamos 449, seleccionada entre otras 750 bacterias lácticas. Estas 7 bacterias se identificaron como *Lactobacillus sake*.

2) El antagonismo ejercido por las cepas seleccionadas en el desarrollo de otros microorganismos obedece a diversos mecanismos: mientras en la cepa 2 se debe a la producción de peróxido de hidrógeno, en el resto sería consecuencia, sobre todo, de la producción de ácido láctico, excepto en la cepa 449 que manifiesta actividad antimicrobiana exocelular en los sobrenadantes libres de células, neutralizados, filtrados, tratados con catalasa y concentrados por liofilización.

3) Todas las cepas de *L. sake* seleccionadas se desarrollaron y acidificaron el medio de cultivo a las temperaturas de 4, 8, 15, 20 y 32 °C, excepto la 449 que no crece a 4 °C y lo hace más lentamente que las otras a 8 °C; a las demás temperaturas ensayadas es comparable al resto de las cepas. Ninguna de ellas produjo niveles detectables de diacetilo/acetoina.

4) Todas las cepas de *L. sake*, seleccionadas por su actividad antimicrobiana poseen plásmidos de distinto tamaño molecular, sin que de momento podamos afirmar si la síntesis de la sustancia inhibidora, se

encuentra vinculada a alguno de ellos. La más eficaz de las técnicas de aislamiento y visualización de plásmidos empleadas fué la miniaturizada y rápida

5) En cultivos mixtos con *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*, utilizando medios líquidos y a las temperaturas de 4, 8, 16 y 24 °C, las cepas 23 y 148 de *L. sake* inhibieron el desarrollo de estos dos microorganismos psicrotrofos de gran interés en la industria alimentaria. La inhibición de *Y. enterocolitica* es más eficaz a las temperaturas de inhibición más altas y en presencia de la cepa 23, ello se debe a la menor producción de ácidos L(+) láctico y D(-) láctico por la cepa 148

6) *List. monocytogenes* es más resistente a la acción antagonista de *L. sake* que *Y. enterocolitica* y si bien ambas cepas lácticas actúan con igual eficacia, posiblemente se debe a que la actividad antimicrobiana exocelular de *L. sake* 148 suple su menor producción de ácido láctico en comparación con *L. sake* 23

7) La cepa de *L. sake* 449 produce una sustancia antimicrobiana exocelular de naturaleza proteica, resistente al calor y bacteriostática frente a *L. fermentum* CECT285. La purificación de dicha actividad por liofilización y cromatografía de filtración en geles, produjo un incremento poco apreciable de la actividad inhibidora específica y una recuperación muy pequeña de la actividad inhibidora original. El análisis de la sustancia antimicrobiana purificada por cromatografía de filtración en geles, reveló que la fracción activa poseía un peso molecular de 30.979 daltons. La electroforesis de la misma sustancia en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico, reveló la existencia de una banda proteica de un peso

molecular aparente de 31 346 daltons. La sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449, se mostró activa frente a bacterias patógenas Gram-positivas de gran interés en la industria alimentaria. Los resultados obtenidos sugieren la posible utilidad de las bacterias lácticas y de sus bacteriocinas, como factores de seguridad de la carne y de los productos cárnicos.

CAPÍTULO VII

TRABAJO FUTURO

Las cepas de *L. sake* aisladas y caracterizadas parcialmente en este trabajo, pueden ser de gran utilidad en la inhibición del desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos de la carne y productos cárnicos. Sin embargo, las condiciones de un sustrato sólido como la carne, son diferentes de las que se encuentran en medios de cultivo líquidos complejos o semidefinidos. Por ello, la síntesis y la actividad de las bacterias lácticas descritas y de las sustancias antimicrobianas producidas por ellas, deben examinarse en un sistema cárnico modelo.

El empleo de cepas bacteriocinogénicas de *L. sake*, como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos, presupone tanto la prevención del desarrollo de microorganismos indeseables, como una mayor homogeneidad del proceso fermentativo. Por ello, el desarrollo y puesta a punto de sistemas novedosos de transformación genética de tales microorganismos, como la electroporación, permitiría la introducción en ellos de genes que codifiquen propiedades de importancia tecnológica. Los determinantes genéticos de la producción de bacteriocinas y de la resistencia a las mismas poseen, gracias a la tecnología del ADN recombinante, un gran potencial como marcadores genéticos o como genes de interés en la futura producción de bacteriocinas como aditivos alimentarios. De aquí que constituya un objetivo prioritario de nuestro trabajo futuro el estudio, lo más amplio posible, de las características genéticas de las cepas de *L. sake* de interés.

De otra parte, el que la sustancia antimicrobiana exocelular de *L. sake* 449 forme agregados proteicos de un tamaño molecular variable, le confiere un gran potencial antigénico. Por este motivo, se pretende examinar la capacidad antigénica de esta sustancia en animales de experimentación. La

obtención de anticuerpos específicos policlonales o monoclonales frente a dicha sustancia podría permitir, tras el desarrollo y puesta a punto de diversas técnicas inmunológicas, como las inmunoenzimáticas (ELISA), la detección y cuantificación de la sustancia antimicrobiana de interés en diversas carnes y productos cárnicos. Asimismo, los anticuerpos específicos podrían permitir la purificación a homogeneidad de la sustancia antimicrobiana, mediante técnicas de cromatografía de afinidad, lo que permitiría su purificación en un solo paso y evitaría la utilización de otros procedimientos de separación proteica menos eficaces.

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- ABDEL-BAR, N. y HARRIS, N. D. (1984). Inhibitory effect of *Lactobacillus bulgaricus* on psychrotrophic bacteria in associative cultures and in refrigerated foods. J. Food Prot., **47**: 61-64.
- ABDEL-BAR, N., HARRIS, N. D. y RILL, R. L. (1987). Purification and properties of an antimicrobial substance produced by *Lactobacillus bulgaricus*. J. Food Sci., **52**: 411-415.
- AHAMAD, N. y MARTH, E. H. (1990). Acid-Injury of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., **53**: 26-29.
- AHMED, A. H., MOUSTAFA, M. K. y EL-BASSIONY, T. W. (1986). Growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in yogurt. J. Food Prot., **49**: 983-985.
- AHN, C. y STILES, M. E. (1990a). Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats. J. Appl. Bacteriol., **69**: 302-310.
- AHN, C. y STILES, M. E. (1990b). Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. Appl. Environ. Microbiol., **56**: 2503-2510.
- ALM, L. (1982). Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. J. Dairy Sci., **65**: 515-520.
- ALM, L., HUMBLE, D., RYD-KJELLEN, E. y SETTERBERG, G. (1983). The effect of acidophilus milk in the treatment of constipation in hospitalised geriatric patients. Symposia of Swedish Nutrition Foundation, **XV**: 131-138.
- ANDERSON, D. G. y Mc KAY, L. L. (1977). Plasmid loss of lactose metabolism, and appearance of partial and full lactose-fermenting revertants in *Streptococcus cremoris* B1. J. Bacteriol., **129**: 367-377.

- ANDERSON, D. G. y Mc KAY, L. L. (1983). Simple and rapid method for isolation of large plasmid DNA from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 549-552.
- ANDERSSON, R. E. (1986). Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Food Microbiol. **3**: 149-160.
- ANDERSSON, R. E., DAESCHEL, M. A. y HASSAN, H. M. (1988). Antimicrobial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Biochimie **70**: 381-390.
- ANONIMO (1980). A survey of nitrosamines in sausages and dry-cured meat products. Food Technol. **34**: 45-51, 53 y 102.
- ARCHER, D. L. (1987). Foodborne Gram-negative bacteria and atherosclerosis: Is there a connection? J. Food Prot. **50**: 783-787.
- ARCHIBALD, A. R. y BADOILEY, J. (1966). The teichoic acids. Adv. Carboh. Chem. **21**: 323-375.
- BACUS, J. (1979). Reduces nitrosamines. Food Eng. **51**: 24.
- BACUS, J. N. y BROWN, W. L. (1981). Use of microbial cultures: meat products. Food Technol. **35**: 74-78.
- BAIRD, D. M. (1977). Probiotics help boost feed efficiency. Feedstuffs **49**: 11-12.
- BANKS, T. G., BOARD, R. G. y SPARKS, N. H. C. (1986). Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. Biotechnol. Appl. Biochem. **8**: 103-114.
- BARAN, W. L. y STEVENSON, K. E. (1975). Survival of selected pathogens during processing of a fermented turkey sausage. J. Food Sci. **40**: 618-620.

- BARBER, L. E. y DEIBEL, R. H. (1972). Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausages. Appl. Microbiol., 24: 891-898.
- BAREFOOT, S. F. y KLAENHAMMER, T. R. (1983). Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., 45: 1808-1815.
- BAREFOOT, S. F. y KLAENHAMMER, T. R. (1984). Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, lactacin B. Antimicrob. Agents Chemother., 26: 328-334.
- BARRIT, M. M. (1936). The identification of the Voges-Proskauer test by the addition of α -naftol. J. Pathol. Bacteriol., 42: 441-443.
- BATT, C. A. (1986). Genetic engineering of *Lactobacillus*. Food Technol., 40: 95-98.
- BEALMEAR, P. M., HOLTERMANN, O. A. y MIRAND, E. A. (1984). Influence of the microflora in the immune response, I: General characteristics of the germ-free animal. En: "The Germ-free Animal in Biomedical Research". M. E. Coates y B. E. Gustafsson (eds.). Laboratory Animals Ltd., London.
- BELKUM, M. J. VAN, HAYEMA, B. J., GEIS, A., KOK, J. y VENEMA, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. Appl. Environ. Microbiol., 55: 1187-1191.
- BERG, R. D. (1983). Translocation of indigenous bacteria from the intestinal tract. En: "Human Intestinal Microflora in Health and Disease", pp. 333-352. D. J. Hentges (ed.), Academic Press, London.
- BERMUDEZ, E., MORALES, P., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. (1989). Enumeration of *Yersinia* sp. from the oral cavity of freshly slaughtered pigs. Proc. 35th Int. Cong. of Meat Science and Technology, vol. 2, Copenhagen, Denmark, pp. 291-294.

- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Lactococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Industrial Microbiol., **2**: 319-322.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1988). Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Lactococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol., **65**: 261-268.
- BIRNBOIM, H. C. y DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., **7**: 1513-1523.
- BLACKWELL, B., MARLEY, E., PRICE, J. y TAYLOR, O. (1967). Hypertensive interactions between monoamine oxidase inhibitors and feedstuffs. Br. J. Psychiatry, **113**: 349-365.
- BLOKSMA, N., ETTEKOVEN, H., HOTHUIS, F. M., VAN NOORLE-JANSE, L., DE REUVER, H. J., KREEFLERBERG, J. G. y WILLERS, J. M. (1981). Effects of lactobacilli on parameters of non-specific resistance of mice. Med. Microbiol. Immunol., **170**: 45-53.
- BOGDANOV, I. G., POPKHIROV, P. y MARINOV, L. (1962). Anticancer effect of antibioticum bulgaricum on sarcoma 180 in the select form of Ehrlich carcinoma. Proc. VIII Int. Cancer Congr., 364.
- BOTTAZZI, V. (1988). An introduction to red-shaped lactic acid bacteria. Biochemie, **70**: 303-315.
- BRESLAW, E. S. y KLEYN, D. H. (1973). *In vitro* digestibility of protein in yogurt at various stages of processing. J. Food Sci., **38**: 1016-1019.
- BROCK, T. D. y DAVIE, J. M. (1963). Probable identity of a group D hemolysin with a bacteriocin. J. Bacteriol., **86**: 700-712.
- BROWN, W. L. (1980). Starter cultures. New versus old techniques. Meat Ind. Res. Conf., Am. Meat Inst. Found., Washington D. C.

- BRUCE, B. B., GILLILAND, S. E., BUSH, L. J. y STALEY, T. E. (1979). Influence of feeding cells of *Lactobacillus acidophilus* on the fecal flora of young dairy calves. Oklahoma Anim. Sci. Res. Rep.: 207-212.
- BUCHANAN, R. L. (1986). Processed meats as a microbial environment. Food Technol., **40**: 134-136 y 138.
- BUCHANAN, R. L., STAHL, H. G. y ARCHER, D. L. (1987). Improved plating media for simplified quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Food Microbiol., **4**: 269-275.
- BUCHANAN, R. L., STAHL, H. G. y WHITING, R. C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite in the growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., **52**: 844-851.
- BUYZE, G., VAN DEN HAMER, J. A. y DE HAAN, P. G. (1957). Correlation between hexose-monophosphate shunt, glycolytic system and fermentation type in lactobacilli. Antonie van Leeuwenhoek, **23**: 345-350.
- CARMINATI, D., GIRAFFA, G. y BOSSI, M. G. (1989). Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., **52**: 614-617.
- CAVETT, J. J. (1963). A diagnostic key for identifying the lactic acid bacteria of vacuum packed bacon. J. Appl. Bacteriol., **26**: 453-470.
- CASTRO, G. A., COTTER, M. V., FERGUSON, J. D. y GORDON, W. (1973). Trichinosis: physiologic factors possibly altering the course of infection. J. Parasitol., **59**: 268-276.
- CHAMPAGNE, C. P., GIRARD, F. y MORIN, N. (1990). Inhibition of the psychrotrophic bacteria of raw milk by addition of lactic acid bacteria. J. Food Prot., **53**: 400-403.
- CHAMPOMIER, M. C., MONTEL, C., GRIMONT, F. y GRIMONT, P. A. D. (1987).

- Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sake*
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 138: 751-758.
- CHASSY, B. M. (1976) A gentle method for the lysis of oral streptococci
Biochem. Biophys. Res. Commun., 68: 603-608.
- CHASSY, B. M. y GIUFFRIDA, A. (1980) A method for the lysis of
Gram-positive asporogenous bacteria with lysozyme Appl. Environ.
Microbiol., 39: 153-158.
- CHASSY, B. M., GIBSON, E. y GIUFFRIDA, A. (1978) Evidence for
extrachromosomal elements in *Lactobacillus* J. Bacteriol., 127:
1576-1578.
- CHASSY, B. M., GIBSON, E. y GIUFFRIDA, A. (1978) Evidence for
plasmid-associated lactose metabolism in *Lactobacillus casei*
subsp. *casei* Curr. Microbiol., 1: 141-144.
- CHAVARRI, F. J. (1987). Preparación de fermentos lácticos concentrados
y su aplicación potencial a la mejora de la calidad microbiológica
del queso de Burgos. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de
Madrid.
- CHILDERS, A. B., TERRELL, R. N., CRAIG, T. M., KAYFUS, T. J. y SMITH, G. C.
(1982). Effect of sodium chloride concentrations, water activity,
fermentation method, and dry time on the viability of *Trichinella*
spiralis in Genoa salami J. Food Prot., 45: 816-819.
- CHRISTIANSEN, L. N., TOMPKIN, R. B., SHAPARIS, A. B., JOHNSTON, R. W. y
KAUTTER, D. A. (1975). Effect of sodium nitrite and nitrate on
Clostridium botulinum growth and toxin production in summer
style sausage. J. Food Sci., 40: 488-490.
- CLIVER, D. O. (1973). Cheddar cheese as a vehicle for viruses. J. Dairy
Sci., 56: 1329-1331.

- CLIVER, D. O. (1976). Viruses. En "Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects", pp. 257-270. M. P. Difiuguereido y D. F. Splitstoesen (eds.). AVI Publishing Co., Westport.
- COALLIER-ASCAH, J. y IDZIAK, E. S. (1985). Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxins. Appl. Microbiol., **49**: 163-167.
- COLE, C. B. y FULLER, R. (1984). Bile acid deconjugation and attachment of chicken gut bacteria: their possible role in growth depression. Br. Poultry Sci., **25**: 277-231.
- COLLINS, M. D., FARROW, J. A. E., PHILLIPS, B. A., FERESU, S. y JONES, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola* and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus *Carnobacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol., **37**: 310-316.
- CORDS, B. R. y Mc KAY, L. L. (1974). Characterization of lactose-fermenting revertants from lactose-negative *Streptococcus lactis* C-2 mutants. J. Bacteriol., **119**: 830-839.
- COX, L. J. (1989). A perspective on listeriosis. Food Technol., **43**: 52-59.
- CURRIER, T. C. y NESTER, E. C. (1976). Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. Anal. Biochem., **76**: 431-441.
- DACRE, J. C. y SHARPE, M. E. (1956). Catalase production by lactobacilli. Nature, **178**: 700.
- DAESCHEL, M. A. (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol., **43**: 164-167.
- DAESCHEL, M. A. y KLAENHAMMER, T. R. (1985). Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol., **50**: 1538-1541.

- DAESCHEL, M. A. y KLAENHAMMER, T. R. (1986). Characterization of a bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., 86: 277.
- DAESCHEL, M. A., MCKENNEY, M. C. y McDONALD, L. C. (1990). Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol., 7: 91-98.
- DAHIYA, R. S. y SPECK, M. L. (1968). Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effects on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci., 51: 1568-1572.
- DALY, C., SANDINE, W. E. y ELLIKER, P. R. (1972). Interaction of food starter cultures and food-borne pathogens: *Streptococcus diacetilactis* versus food pathogens. J. Milk Food Technol., 35: 349-357.
- DALY, C., LACHANCE, M., SANDINE, W. E. y ELLIKER, P. R. (1973). Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter cultures and chemical acidulation. J. Food Sci., 38: 426-430.
- DAVEY, G. P. y RICHARDSON, B. C. (1981). Purification and some properties of diploceccin from *Streptococcus crameris* 346. Appl. Environ. Microbiol., 41: 84-89.
- DAVIES, F. L., UNDERWOOD, H. M. y GASSON, M. J. (1981). The value of plasmid profiles for strain identification in lactic streptococci and the relationship between *Streptococcus lactis* 712, ML3 y C2. J. Appl. Bacteriol., 51: 325-327.
- DEIBEL, R. H. y NIVEN, C. F. (1958). Microbiology of meat curing I. The occurrence and significance of a motile microorganism of the genus *Lactobacillus* in ham curing brines. Appl. Microbiol., 6: 323-327.
- DEKLERK, H. C. (1967). Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. Nature, 192: 340-341.

- DEKLERK, H. C. y SMIT, J. A. (1967). Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. J. Gen. Microbiol., **48**: 309-316.
- DEMPSTER, J. F. (1972). Some characteristics of microorganisms isolated from vacuum-packed bacon. Ir. J. Agric. Res., **11**: 351-361.
- DENNY, C. B., SHARPE, L. E. y BOHRER, C. W. (1961). Effect of tylosin and nisin on canned-food spoilage bacteria. Appl. Microbiol., **9**: 108-110.
- DETHMERS, A. E., ROCK, H., FAZIO, T. y JOHNSTON, R. W. (1975). Effect of added sodium nitrite and sodium nitrate on sensory quality and nitrosamine formation in Thüringer sausage. J. Food Sci., **40**: 491-495.
- DIEZ, V. A. (1983). Actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas en los alimentos. IX Cong. Nac. Microbiol., pp. 663-669, Valladolid.
- DOBZANSKI, W. T., BARDOWSKI, J., KOZAK, W. y ZAJDEL, J. (1982). Lactostreptocins: Bacteriocins of lactic streptococci. En: "Microbiology", pp. 225-229. D. Schlessinger (ed.). A. S. M., Washington, D. C.
- DOORES, S. (1983). Organic acids. En: "Antimicrobials in Foods", pp. 75-99. A. L. Branen y P. M. Davidson (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York.
- EDDY, B. P. (1960). The use and meaning of the term "psychrotrophic". J. Appl. Bacteriol., **23**: 189-190.
- EGAN, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. Antonie van Leeuwenhoek, **49**: 327-336.
- EGAN, A. F., SHAY, B. J. y ROGERS, P. J. (1989). Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum-packaged beef. J. Appl. Bacteriol., **67**: 255-262.

- EITENMILLER, R. R., KOEHLER, P. E. y REAGAN, J. O. (1978) Tyramine in fermented sausages factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase. J. Food Sci. **43**: 689-693.
- EL-GENDY, M. y MARTH, E. H. (1980) Growth of toxigenic and non-toxicogenic aspergilli and penicillia at different temperatures and in the presence of lactic acid bacteria. Archiv. für Lebensmittelhygiene, **31**: 192-195.
- EL-GENDY, S. M., ABDEL-GALIL, H., SHANIN, Y. y HEGAZI, F. Z. (1983) Acetoin and diacetyl production by homo- and heterofermentative lactic acid bacteria. J. Food Prot. **46**: 420-425.
- ELLIKER, P. R., SANDINE, W. A., HAUSER, B. A. y MOSELEY, W. K. (1964) Influence of culturing cottage cheese dressing with different organisms on flavor and keeping quality. J. Dairy Sci. **47**: 680-684.
- ELLINGER, D. K., MULLER, L. D. y GANTZ, P. J. (1978) Influence of feeding fermented colostrum and *Lactobacillus acidophilus* on fecal flora and selected blood parameters of young dairy calves. J. Dairy Sci. **61**: 126-130.
- FARBER, J. M. (1989) Foodborne pathogenic microorganisms: characteristics of the organisms and their associated diseases. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. **22**: 311-321.
- FARBER, J. M., TITTINGER, F. y GOUR, L. (1988) Surveillance of raw-fermented (dry-cured) sausages for the presence of *Listeria* spp. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. **21**: 430-434.
- FARBER, J. M., SANDERS, G. W., DUNFIELD, S. y PRESCOTT, R. (1989) The effect of various acidulants on the growth of *Listeria monocytogenes*. Let. Appl. Microbiol. **9**: 181-183.
- FARRAG, S. A. y MARTH, E. H. (1989) Growth of *Listeria monocytogenes* in the presence of *Pseudomonas fluorescens* at 7 or 13 °C in skim milk. J. Food Prot. **52**: 852-855.

- FERREIRA, C. L. y GILLILAND, S. E. (1988). Bacteriocin involved in premature death of *Lactobacillus acidophilus* NCFM during growth at pH 6. J. Dairy Sci. 71: 306-315.
- FLEMING, H. P., ETCHELLS, J. L. y COSTILOW, R. N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. Appl. Microbiol. 30: 1040-1042.
- FRANK, J. F. y MARTH, E. H. (1977). Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* by homofermentative lactic acid bacteria in skim milk. J. Food Prot. 40: 749-753.
- FRANK, J. F., MARTH, E. H. y OLSON, N. F. (1978). Behaviour of enteropathogenic *Escherichia coli* during manufacture of brick cheese. J. Food Prot. 41: 111-115.
- FREDERICQ, P. (1948). Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobacteriaceae. Rev. Belge. Pathol. Med. Exp. 19 (Suppl. 4): 1-107.
- FRIEND, B. A. y SHAHANI, K. M. (1984). Antitumor properties of lactobacilli and dairy products fermented by lactobacilli. J. Food Prot. 47: 717-723.
- FUKUSHIMA, H. y GOMYODA, M. (1986). Inhibition of *Yersinia enterocolitica* serotype O3 by natural microflora of pork. Appl. Environ. Microbiol. 51: 990-994.
- FULLER, R. (1977). The importance of lactobacilli in maintaining normal microbial balance in the crop. Br. Poultry Sci. 18: 85-89.
- FULLER, R., NEWMAN, H. N. y SNOEYENBOS, G. H. (1986). Microbial competition in the mouth and gastrointestinal tract. En "Natural Antimicrobial Systems". G. W. Gould, M. E. Rhodes-Roberts, A. K. Charnley, R. M. Cooper y R. g. Board (eds.). Bath University Press, Bath.

- FULLER, R. (1989) Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. **65**, 365-378.
- GAGLIANO, V. J. y HINSDILL, R. D. (1970) Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. J. Bacteriol. **104**, 117-125.
- GALLAGHER, C. R., MOLESON, A. L. y CALDWELL, J. H. (1974) Lactose intolerance and fermented dairy products. J. Am. Vet. Assoc. **65**, 418-419.
- GARVIE, E. J., COLE, C. B., FULLER, R. y HEWITT, D. (1984) The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and the metabolism of lactose in the rat. J. Appl. Bacteriol. **56**, 237-245.
- GASSON, M. J. (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. **154**, 1-9.
- GASSON, M. J. (1989) Comunicación personal.
- GASSON, M. J. y DAVIES, F. L. (1980) High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. J. Bacteriol. **143**, 1260-1264.
- GASSON, M. J. y DAVIES, F. L. (1984) The genetics of dairy lactic acid bacteria. En: "Advances in the microbiology and biochemistry of cheese and fermented milk", pp. 99-126. F. L. Davies y B. A. Law (eds) Elsevier Appl. Sci. Publishers, London.
- GEIS, A., SINGH, J. y TEUBER, M. (1983) Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. Appl. Environ. Microbiol. **45**, 205-211.
- GENIGEORGIS, C. (1976) Quality control for fermented meats. J. Am. Vet. Med. Assoc. **169**, 1220-1228.
- GENIGEORGIS, C. (1981) Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in food. J. Am. Vet. Med. Assoc. **179**, 1410-1417.

- GENIGEORGIS, C., SAVOUKIDIS, M. y MARTIN, S. (1971). Initiation of staphylococcal growth in processed meats environments. Appl. Microbiol. **21**: 940-942.
- GEORGE, S. M., LUND, B. y BRACKLEHURST, T. F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. **6**: 153-156.
- GIBBS, P. A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. J. Appl. Bacteriol. (Symp. Suplem.): 51-58.
- GILLILAND, S. E. (1989). Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. J. Dairy Sci. **72**: 2483-2494.
- GILLILAND, S. E. y SPECK, M. L. (1972). Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. J. Milk Food Technol. **35**: 307-310.
- GILLILAND, S. E. y SPECK, M. L. (1975). Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and pediococci in nonfermented foods. J. Food Sci. **40**: 903-905.
- GILLILAND, S. E. y SPECK, M. L. (1977). Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. J. Food Prot. **40**: 820-823.
- GILLILAND, S. E. y SPECK, M. L. (1977). Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. **33**: 15-18.
- GILLILAND, S. E. y KIM, H. S. (1984). Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. J. Dairy Sci. **67**: 1-6.
- GILLILAND, S. E. y LARA, R. C. (1988). Influence of storage at freezing and at subsequent refrigeration temperatures on β -galactosidase activity of *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. **54**: 898-902.

- GILLILAND, S. E., NELSON, C. R. y MAXWELL, C. (1985). Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* Appl. Environ. Microbiol. **49**: 377-381.
- GOEPFERT, J. M. y HICKS, R. (1969). Effect of volatile fatty acids on *Salmonella typhimurium* J. Bacteriol. **97**: 956-958.
- GOEPFERT, J. M. y CHUNG, K. C. (1970). Behavior of *Salmonella* during the manufacture and storage of a fermented sausage product. J. Milk Food Technol. **33**: 185-191.
- GOLDIN, B. R. y GORBACH, S. L. (1977). Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, lactobacillus supplements and dimethylhydrazine. Cancer **40**: 2421-2426.
- GOLDIN, B. R. y GORBACH, S. L. (1984). The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Am. J. Clin. Nutr. **39**: 756-761.
- GONZALEZ, C. F. y KUNKA, B. S. (1987). Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici* Appl. Environ. Microbiol. **53**: 2534-2538.
- GORBACH, S. L., CHANG, T. W. y GOLDIN, B. (1987). Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. Lancet **11**: 1519.
- GORDON, D., MACRAE, J. y WHEATER, D. M. (1957). A lactobacillus preparation for use with antibiotics. Lancet **272**: 889.
- GRAF, W. (1983). Studies on the therapeutic properties of acidophilus milk. Symposia of Swedish Nutrition Foundation **XY**, 119-121.
- GRAHAM, D. C. y MCKAY, L. L. (1985). Plasmid DNA in strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus* Appl. Environ. Microbiol. **50**: 532-534.

- GRATIA, A. (1946). Techniques selectives pour la recherche systématique des germes antibiotiques. C. R. Seances Soc. Biol. Paris, 140: 1053-1055.
- GRAU, F. H. (1980). Inhibition of the anaerobic growth of Brochothrix thermosphacta by lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 40: 433-436.
- GRAY, J. I. y RANDALL, C. J. (1979). The nitrite/N-nitrosamine problem in meats: an update. J. Food Prot., 42: 168-179.
- GRAY, M. E. y KILLINGER, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. Bacteriol. Rev., 30: 309-382.
- GRUNEWALD, K. K. (1982). Serum cholesterol levels in rat fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. J. Food Sci., 47: 2078-2079.
- HANNA, M. O., STEWART, J. C., ZINK, D. L., CARPENTER, Z. L. y VANDERZANT, C. (1977). Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures. J. Food Sci., 42: 1180-1184.
- HARGROVE, R. E. y ALFORD, J. A. (1978). Growth rate and feed efficiency of rats fed yogurt and other fermented milks. J. Dairy Sci., 61: 11-15.
- HARRIS, L. J., DAESCHEL, M. A., STILES, M. E. y KLAENHAMMER, T. R. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 52: 384-387.
- HARRISON, V. C. y PEAT, G. (1975). Serum cholesterol and bowel flora in the newborn. Am. J. Clin. Nutr., 28: 1351-1353.
- HASTINGS, J. W. y HOLZAPFEL, W. H. (1987). Numerical taxonomy of lactobacilli surviving radurization of meat. Int. J. Food Microbiol., 4: 33-49.

- HATCH, R. C., THOMAS, R. O. y THAYNE, W. V. (1973). Effect of adding *Lactobacillus acidophilus* to milk fed to baby calves. J. Dairy Sci. **56**: 682-685.
- HELLING, R. B., GOODMAN, H. M. y BOYER, H. W. (1974). Analysis of *EcoRI* fragments of DNA from lamboid bacteriophages and other viruses for agarose gel electrophoresis. J. Virol. **14**: 1235-1244.
- HENSEL, R., MAYR, U., LINS, C. y KANDLER, O. (1977). Aminoacid sequence of a dodecapeptide from the substrate-binding region of the L-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus xylosus* and *Bacillus stearothermophilus* Hoppe-Segler's Z. Physiol. Chem. **362**: 1031-1036.
- HERMANN, J. E. y CLIVER, D. O. (1973). Enterovirus persistence in sausage and ground beef. J. Milk Food Technol. **36**: 426-428.
- HITCHENER, B. J., EGAN, A. F. y ROGERS, P. J. (1982). Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. J. Appl. Bacteriol. **52**: 31-37.
- HOLY, A. V. y HOLZAPFEL, W. H. (1988). The influence of extrinsic factors on the microbiological spoilage pattern of ground beef. Int. J. Food Microbiol. **6**: 269-280.
- HOLZAPFEL, W. H. y GERBER, E. S. (1983). *Lactobacillus divergens* sp. nov. A new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L-lactate. Syst. Appl. Microbiol. **4**: 522-534.
- HOLZAPFEL, W. H. y GERBER, E. S. (1986). Predominance of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* in the spoilage association of vacuum packaged meat products. Abstr. 32nd Eur. Meet. Meat Research, pp. 26. Ghent.
- HOOVER, D. G., WALSH, P. M., KOLAETIS, K. M. y DALY, M. M. (1988). A bacteriocin produced by *Pedococcus* species associated with a 5.5 megadalton plasmid. J. Food Prot. **51**: 29-31.

- HOSONO, A. y TOKITA, F. (1977). Inhibitory effect of cell free extracts from lactic acid bacteria on growth of *Escherichia coli* Japan J. Zootech. Sci., **48**: 250.
- HOUSTON, D. (1979). Acid-producing microorganisms in meat products for nitrite dissipation. Fed. Reg., **44**: 9372.
- HUEPPE, F. (1884). Milchsäurebazillus syn. *Bacterium acidilactici* Zool. Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamt., **2**: 337-340.
- HURST, A. (1973). Microbial antagonism in foods. Can. Inst. Food Technol. J., **6**: 80-90.
- HURST, A. (1981). Nisin. Adv. Appl. Microbiol., **27**: 85-123.
- HURST, A. (1983). Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. En "Antimicrobials in Foods", pp. 327-351. A. L. Branen y M. Davidson (eds.). M. Dekker Inc., New York.
- INGRAM, M. (1975). The lactic acid bacteria. A broad view. En: "Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food", pp. 1-13. J. G. Carr, C. V. Cutting y G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- JAY, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol., **44**: 525-532.
- JOERGER, M. C. y KLAENHAMMER, T. R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol., **167**: 439-446.
- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P., CASSENS, R. G. y SCHOENI, J. L. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. Appl. Environ. Microbiol., **54**: 497-501.
- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P. y CASSENS, R. G. (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. Int. J. Food Microbiol., **6**: 243-247.

- JOHNSON, J. L., DOYLE, M. P. y CASSENS, R. G. (1990). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products. A review. J. Food Prot., **53**: 81-91.
- JOHNSON, P. H. y GROSSMAN, L. I. (1977). Electrophoresis of DNA in agarose gels. Optimizing separations of conformation isomers of double and single stranded DNAs. Biochem., **16**: 4217-4224.
- JOHNSTON, M. A. y DELWICHE, E. A. (1965). Distribution and characteristics of the catalases of *Lactobacillaceae*. J. Bact., **90**: 347-351.
- JOSEPH, A. L., BERRY, B. W., WAGNER, S. B. y DAVIS, L. A. (1978). Lactic acid, pH and bacterial values of dry fermented salami containing mechanically deboned beef and structured soy protein fiber. J. Food Prot., **41**: 881-884.
- KANDLER, O. (1983). Carbohydrate metabolism of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, **49**: 209-224.
- KANDLER, O. y WEISS, O. (1986). Regular, nonsporing Gram-positive rods. En: "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", vol. 2, pp. 1208-1234. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe y J. G. Holt (eds.). Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
- KANTOR, M. A. y POTTER, N. N. (1975). Persistence of echovirus and poliovirus in fermented sausages. Effect of sodium nitrite and processing variables. J. Food Sci., **40**: 968-972.
- KARUNARATNE, A., WEZENBERG, E. y BULLERMAN, L. B. (1990). Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. J. Food Prot., **53**: 230-236.
- KATAGIRI, H., KITAHARA, K. y FUKAMI, K. (1934). The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mash for sake manufacture IV. Classification of the lactic acid bacteria. Bulletin of the Agricultural Society (Japan), **10**: 156-157.

- KATO, I., KOBAYASHI, S., YOKOKURA, T. y MUTAI, M. (1981). Antitumour activity of *Lactobacillus casei* in mice. Gann, 72: 517-523.
- KATO, I., YOKOHURA, T. y MUTAI, M. (1983). Macrophage activation by *Lactobacillus casei* in mice. Microbiol. Immunol., 27: 611-618.
- KEKESSY, D. A. y PIGUET, J. D. (1970). New method for detecting bacteriocin production. Appl. Microbiol., 20: 282-283.
- KIM, H. S. y GILLILAND, S. E. (1983). *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. J. Dairy Sci., 66: 959-966.
- KITAHARA, K. y SUZUKI, J. (1963). *Sporolactobacillus* nov. subgen. J. Gen. Appl. Microbiol., 9: 59-71.
- KITCHELL, A. G. y SHAW, B. G. (1975). Lactic acid bacteria in fresh and cured meat. En: "Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food", pp. 209-220. C. J. G. Carr, C. V. Cutting y G. C. Whiting (eds.), Academic Press, London.
- KLAENHAMMER, T. R. (1984). A general method for plasmid isolation in lactobacilli. Current Microbiol., 10: 23-28.
- KLAENHAMMER, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie, 70: 337-349.
- KLAENHAMMER, T. R., MCKAY, L. L. y BALDWIN, K. A. (1978). Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. Appl. Environ. Microbiol., 35: 592-600.
- KLEINLEIN, N. y UNTERMANN, F. (1990). Growth of pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains in minced meat with and without protective gas with considerations of the competitive background flora. Int. J. Food Microbiol., 10: 65-72.

- KNOX, K. W. y HALL, E. A. (1964). The relationship between the capsular and cell wall polysaccharids of strains of *Lactobacillus casei* var. *rhamnosus*. J. Gen. Microbiol., **37**: 433-438.
- KNOX, K. W. y WICKEN, A. J. (1973). Immunological properties of teichoic acids. Bacteriol. Rev., **37**: 215-257.
- KORKEALA, H. y MÄKELÄ, P. (1989). Characterization of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed cooked ring sausages. Int. J. Food Microbiol., **9**: 33-43.
- KOTTER, L., FISCHER, A., SCHMIDT, H., WALLERS, C. L., HAUSER, E. y HEIZ, H. J. (1976). Zum vorkommen von nitrosaminen in fleischerzeugnissen und untersuchungen an schnittfesten rohwürsten bei unterschiedlichen Zusätzen. Fleischwirtsch., **56**: 997-1007.
- KOZAK, W., BARDOWSKI, J. y DOBRZANSKI, W. T. (1978). Lactostreptocins, acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res., **45**: 247-257.
- KROGER, M. (1976). Quality of yogurt. J. Dairy Sci., **59**: 344-350.
- KUTTNER, A. G. (1966). Production of bacteriocines by group A streptococci with special reference to nephritogenic types. J. Exp. Med., **124**: 279-291.
- LABAN, P., FAVRE, C., RAMET, F. y LARPENT, J. P. (1978). Lactobacilli isolated from french saucisson (taxonomic study). Zbl. Bakt., **1**: 105-111.
- LAEMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**: 680-685.
- LAW, B. A. y KOLSTAD, J. (1983). Proteolytic systems in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, **49**: 225-245.

- LEBLANC, D. J. y LEE, L. N. (1979). Rapid screening procedure for detection of plasmids in streptococci. J. Bacteriol., **140**: 1112-1115.
- LEE, L. N., HANSEN, J. B., JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. K. y CHASSY, B. M. (1982). Cloning and expression of the β -D-phosphogalactosidase galactohydrolase gene of *Lactobacillus casei* in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., **152**: 1138-1146.
- LEISTNER, L. y RODEL, W. (1976). The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms. En: "Intermediate Moisture Foods", pp. 120-134. R. Davies, G. G. Birch y K. J. Parker (eds.). Appl. Sci. Pub., London.
- LIEPE, H. U. (1986). Using a new lactobacilli starter culture in dry sausage technology. Fleischwirtsch., **66**: 1027-1028.
- LIN, J. H. C. y SAVAGE, D. C. (1986). Genetic transformation of rifampicin resistance in *Lactobacillus acidophilus*. J. Gen. Microbiol., **132**: 1207-1211.
- LONDON, J. (1976). The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. Ann. Rev. Microbiol., **30**: 279-301.
- LOVETT, J. (1989). *Listeria monocytogenes*. En: "Foodborne bacterial pathogens", pp. 283-309. P. D. Michael (ed.). Marcel Dekker, Inc., New York.
- LÜCKE, F. K. (1986). Microbiological processes in the manufacture of dry sausages and raw ham. Fleischwirtsch., **66**: 1505-1509.
- LÜCKE, F. K. y HECHELMANN, H. (1987). Starter cultures for dry sausages and raw ham. Fleischwirtsch., **67**: 307-314.
- LYON, W. J. y GLATZ, B. A. (1991). Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 701-706.

- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. y SAMBROOK, J. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor.
- MANN, J. C. DE, ROGOSA, M. y SHARPE, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact., **23**: 130-135.
- MANN, S. O. y OXFORD, A. E. (1954). Studies of some presumptive lactobacilli isolated from the rumens of young calves. J. Gen. Microbiol., **11**, 83-90.
- MANN, S. V. y SPOERRY, A. (1974). Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. Am. J. Clin. Nutr., **27**: 462-467.
- MARKWELL, M. A. K., HAAS, S. M., BIEBER, L. L. y TOLBERT, N. E. (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. Anal. Biochem., **87**: 206-210.
- MASTERS, B. A., OBLINGER, J. L., GOODFELLOW, S. J., BACUS, J. N. y BROWN, W. L. (1981). Fate of *Salmonella newport* and *Salmonella typhimurium* inoculated into summer sausage. J. Food Prot., **44**: 527-530.
- MATHER, D. W. y BABEL, F. J. (1959). Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus*. J. Dairy Sci., **42**: 1917-1926.
- MERRIL, C. R., GOLDMAN, D., SEDMAN, S. A. y EBERTH, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science, **211**: 1437-1438.
- MCKAY, L. L. (1983). Functional properties of plasmids in lactic streptococci. Antonie van Leeuwenhoek, **49**: 259-274.
- MCKAY, L. L., BALDWIN, K. A. y ZOTTOLA, E. A. (1972). Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol., **23**:

1090-1096.

- McKERCHER, P. D., HESS, W. R. y HAMDY, F. (1978). Residual viruses in pork products. Appl. Environ. Microbiol. **35**: 142-145.
- METAXOPOULOS, J., GENIGEORGIS, G., FANELLI, M. J., FRANTI, C. y COSMA, E. (1981). Effect of starter cultures and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. Appl. Environ. Microbiol. **42**: 863-871.
- METCHNIKOFF, E. (1907). Prolongation of Life. Heinemann, London.
- MEYERS, J. A., SANCHEZ, D., ELWELL, L. P. y FALKOW, S. (1976). Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. **127**: 1529-1537.
- MILES, R. D., ARAFA, A. S., HARMS, R. H., CARLSON, C. W., REID, B. L. y CRAWFORD, J. S. (1981). Effects of a living non-freeze dried *Lactobacillus acidophilus* culture on performance, egg-quality and gut microflora in commercial layers. Poultry Sci. **60**: 993-1004.
- MITCHELL, I. G. y KENWORTHY, R. (1976). Investigations on a metabolite from *Lactobacillus bulgaricus* which neutralizes the effect of enterotoxin from *Escherichia coli* pathogenic for pigs. J. Appl. Bact. **41**: 163-174.
- MOBERG, L. (1989). Good manufacturing practices for refrigerated foods. J. Food Prot. **52**: 363-367.
- MOL, J. H. H., HIETBRING, J. A. E., MOLLEN, H. W. M. y VAN TINTERIN, J. (1971). Observations on the microflora of vacuum-packed sliced cooked meat products. J. Appl. Bacteriol. **34**: 377-397.
- MONTEL, M. C., TALON, R. y CHAMPOMIER, M. C. (1989). Identification of some lactic acid bacteria from meat. Proc. 35th Int. Cong. of Meat Science and Technology, vol. 2, pp. 299-301. Copenhagen.

- MONTVILLE, T. J., MEYER, M. E. y HSU, A. H. (1987). Influence of carbon substrates on lactic acid, cell mass and diacetyl-acetoin production in *Lactobacillus plantarum*. J. Food Prot., **50**: 42-46.
- MORISHITA, T., FUDADA, T., SHIROTA, M. y YURA, T. (1974). Genetic basis of nutritional requirements in *Lactobacillus casei*. J. Bacteriol., **120**: 1078-1084.
- MORISHITA, T., DEGUCHI, Y., YAJIMA, M., SAKURAL, T. y YURA, T. (1981). Multiple nutritional requirement of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. J. Bacteriol., **148**: 64-71.
- MORISHITA, Y. y SHIRUMIZU, K. (1986). Characterization of lactobacilli isolated from meats and meat products. Int. J. Food Microbiol., **3**: 19-29.
- MORRILL, J. L., DAYTON, A. D. y MICKELSEN, R. (1977). Cultured milks and antibiotics for young calves. J. Dairy Sci., **60**: 1105.
- MORTVEDT, C. I. y NES, I. F. (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. J. Gen. Microbiol., **136**: 1601-1607.
- MURALIDHARA, K. S., SHEGGEY, G. G., ELLIKER, P. R., ENGLAND, D. C. y SANDINE, W. E. (1977). Effect of feeding lactobacilli on the coliform and *Lactobacillus* flora of intestinal tissue and feces from piglets. J. Food Prot., **40**: 288-295.
- MURIANA, P. M. y KLAENHAMMER, T. R. (1987). Conjugal transfer of plasmid encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. Appl. Environ. Microbiol., **53**: 553-560.
- MURIANA, P. M. y KLAENHAMMER, T. R. (1991). Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol., **57**: 114-121.

- NAKAYAMA, O. (1960). Properties of wild lactobacilli. Bull. Fac. Agric. Tamagawa Univ., 1: 73.
- NES, I. F. (1984). Plasmid profiles of ten strains of *Lactobacillus plantarum* FEMS Microbiol. Lett., 21: 359-361.
- NEVE, H. A., GEIS, A. y TEUBER, M. (1984). Conjugal transfer and characterization of bacteriocin plasmids in group N (lactic acid) streptococci. J. Bacteriol., 157: 833-838.
- NIELSEN, H. J. S. y ZEUTHEN, P. (1985). Influence of lactic acid bacteria and the overall flora on development of pathogenic bacteria in vacuum-packed, cooked emulsion-style sausage. J. Food Prot., 48: 28-34.
- NIELSEN, J. W. y GILLILAND, S. E. (1985). Variations in cholesterol assimilation by individual strains of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* from human intestines. J. Dairy Sci., 68 (Suppl. 1): 83-88.
- NIELSEN, J. W., DICKSON, J. S. y CROUSE, J. D. (1990). Use of a bacteriocin produced by *Pedococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl. Environ. Microbiol., 56: 2142-2145.
- NISKANEN, A. y NURMI, E. (1976). Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. Appl. Microbiol., 34: 11-20.
- NOUT, M. J. R., ROMBOUTS, F. M. y HAVELAAR, A. (1989). Effect of accelerated natural lactic fermentation of infant foods ingredients on some pathogenic microorganisms. Int. J. Food Microbiol., 8: 351-361.
- NURMI, E. (1966). Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. Acta Agr. Fenn., 108: 1-13.

- OBRADOVIC, D., CAROSKI, D., KERECKI, Z., PERUNOVIC, M., RADOVANOVIC, R. y POPOVIC, J. (1989). Effect of micrococci and lactobacilli on the production of dry sausage. Proc. 35th Int. Cong. Meat Sci. Technol. 2: 313-317.
- OMS (1974). Toxicological evaluation of some additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Food Add. Ser. 5, Geneva.
- ORBERG, P. K. y SANDINE, W. E. (1984). Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp.. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1129-1132.
- ORDÓÑEZ, J. A. (1979). Random number sampling method for estimation of lactic acid bacteria. J. Appl. Bacteriol. 46: 351-353.
- ORLA-JENSEN, S. (1919). The Lactic Acid Bacteria. Andr. Fred. Host & Son, Copenhagen.
- ORTH, R. y MROZEK, H. (1989). Is the control of *Listeria*, *Campylobacter* and *Yersinia* a disinfection problem?. Fleischwirtsch. 69: 1575-1576.
- PALUMBO, S. A. (1986). Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens?. J. Food Prot. 49: 1003-1009.
- PALUMBO, S. A., SMITH, J. L., GENTILCORE, K. M. y FIDDLER, W. (1974). Investigations on the possible occurrence of nitrosamines in Lebanon bologna. J. Food Sci. 39: 1257-1258.
- PARK, H. S. y MARTH, E. H. (1972). Behavior of *Salmonella typhimurium* in skim milk during fermentation by lactic acid bacteria. J. Milk Food Technol. 35: 482-488.
- PARK, H. S., MARTH, E. H. y OLSON, N. F. (1973). Fate of enteropathogenic strains of *Escherichia coli* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. J. Milk Food Technol. 36: 543-546.

- PARKER, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotics story. Animal Nutrition and Health, 29: 4-8.
- PERDIGON, G., DE MACIAS, M. E. N., ALVAREZ, S., OLIVER, G. y DE RUIZ HOLGADO, A. P. P. (1986). Effect of orally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. Infect. Immun., 53: 404-410.
- POLLMAN, D. S. (1986). Additives, flavors, enzymes and probiotics in animal feeds. Proc. 22nd Ann. Nutrition Conference. University of Guelph.
- POLLMAN, D. S., DANIELSON, D. M., WREN, W. D., PEO, E. R. y SHAHANI, K. M. (1980). Influence of *Lactobacillus acidophilus* inoculum on gnotobiotic and conventional pigs. J. Anim. Sci., 51: 629-637.
- PRICE, R. J. y LEE, J. S. (1970). Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. J. Milk Food Technol., 33: 13-18.
- PUCCI, M. J., VEDAMUTHU, E. R., KUNKA, B. S. y VANDENBERGH, P. A. (1988). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol., 54: 2349-2353.
- RACCACH, M. y BAKER, R. C. (1978). Formation of hydrogen peroxide by meat starter cultures. J. Food Prot., 41: 798-799.
- RACCAH, M. y HENNINGSEN, E. C. (1984). Role of lactic acid bacteria, curing salts, spices and temperature in controlling the growth of *Yersinia enterocolitica*. J. Food Prot., 47: 354-358.
- RACCAH, M., BAKER, R. C., REGENSTEIN, J. M. y MULNIX, E. J. (1979). Potential application of microbial antagonism to extended storage ability of a flesh type food. J. Food Sci., 44: 43-46.
- RACCACH, M., McGRATH, R. y DAFTARIAN, H. (1989). Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus*, toward *Listeria monocytogenes*. Int. J. food Microbiol., 9: 25-32.

- RAMMELSBURG, M. y RADLER, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. J. Appl. Bacteriol., **69**: 177-184.
- RAY, S. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1988). Plasmid linkage of pediococin ACh activity and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. 88th Ann. Meet. American Society for Microbiology, H-9. Washington.
- RAY, S. K., JOHNSON, M. C. y RAY, B. (1989). Bacteriocin plasmids of *Pediococcus acidilactici*. J. Ind. Microbiol., **4**: 163-171.
- REDDY, G. V., SHAHANI, K. M. y BANERJEE, M. R. (1973). Inhibition effect of the yoghurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. J. Nat. Cancer Inst., **50**: 815-817.
- REDDY, G. V., FRIEND, B. A., SHAHANI, K. M. y FARMER, R. E. (1983). Antitumor activity of yoghurt components. J. Food Prot., **46**: 8-11.
- REDDY, S. G., HENRICKSON, R. L. y OLSON, H. C. (1970). The influence of lactic cultures on ground beef quality. J. Food Sci., **35**: 787-791.
- REDDY, S. G., CHEN, M. L. y PATEL, P. J. (1975). Influence of lactic cultures on the biochemical, bacterial and organoleptic changes in beef. J. Food Sci., **40**: 314-318.
- REITER, B. y HÄRNULV, B. G. (1984). Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. J. Food Prot., **47**: 724-730.
- RETTGER, L. F. y CHEPLIN, H. A. (1921). A Treatise on the Transformation of the Intestinal Flora with Special Reference to the Implantation of *Bacillus acidophilus* Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- REUTER, G. (1975). Classification problems, ecology and some biochemical activities of lactobacilli of meat products. En: "Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food", pp. 221-229. J. C. Carr, C. V. Cutting y G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.

- REUTER, G. (1981). Psychrotrophic lactobacilli in meat products. En: "Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity", pp. 253-258. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian y N. Skovgaard (eds.). Academic Press, London.
- RICE, S. L. y KOEHLER, P. E. (1976). Tyrosine and histidine decarboxylase activities of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus* species and the production of tyramine in fermented sausages. J. Milk Food Technol., **39**: 166-169.
- RIEMANN, H., LEE, W. H. y GENIGEORGIS, C. (1972). Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-preserved meat products. J. Milk Food Technol., **35**: 514-523.
- RODRIGUEZ, J. M., SOBRINO, O. J., FERNANDEZ, M. F., HERNANDEZ, P. E. y SANZ, B. (1989). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry fermented sausages. Proc. 35th Int. Cong. of Meat Science and Technology, vol. 2., pp. 308-312, Copenhagen, Denmark.
- ROGOSA, M. (1961). Experimental conditions for nitrate reduction by certain strains of the genus *Lactobacillus*. J. Gen. Microbiol., **24**: 401-408.
- ROGOSA, M. (1970). Characters used in the classification of lactobacilli. Int. J. Syst. Bacteriol., **20**: 519-534.
- ROMERO, D. A. y MCKAY, L. L. (1985). Isolation and plasmid characterization of a *Lactobacillus* species involved in the manufacture of fermented sausage. J. Food Prot., **48**: 1208-1035.
- ROTH, L. A. y CLARK, D. S. (1975). Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef. Can. J. Microbiol., **21**: 629-632.
- ROWLAND, I. R. y GRASSO, P. (1975). Degradation of N-nitrosamine by intestinal bacteria. Appl. Microbiol., **29**: 7-12.

- RUBIN, H. E. y VAUGHAN, F. (1979). Elucidation of the inhibitory factors of yoghurt against *Salmonella typhimurium*. J. Dairy Sci., **62**: 1873-1879.
- SABINE, D. B. (1963). An antibiotic-like effect of *Lactobacillus acidophilus*. Nature, **199**: 811.
- SAITO, H., TOMIOKA, H. y SATO, K. (1981). Enhanced resistance of *Lactobacillus* against *Listeria* infection in mice. Medicine and Biology, **102**: 273-277.
- SAVOY DE GIORI, G., FONT DE VALDES, G., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. y OLIVER, G. (1986). Effect of temperature and pH on diacetyl production by lactic acid bacteria. Milchwissensch., **41**: 80-81.
- SCHIEMANN, D. A. y OLSON, S. A. (1984). Antagonism by Gram-negative bacteria to growth of *Yersinia enterocolitica* in mixed cultures. Appl. environ. Microbiol., **48**: 539-544.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1987a). Starter cultures for dry sausages and raw ham. Fleischwirtsch., **67**: 307-314.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1987b). Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiol., **4**: 199-208.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1989a). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol., **55**: 1901-1906.
- SCHILLINGER, U. y LÜCKE, F. K. (1989b). Inhibiting salmonellae growth in fresh spreadable Mettwurst (dry sausage eaten relatively fresh) made without sugar. Fleischwirtsch., **69**: 879-882.
- SCHLEIFER, K. H. y KANDLER, O. (1972). Peptidoglycan types of bacteria cell walls and their taxonomic implications. Bact. Rev., **36**: 407-477.

- SCHLEIFER, K. H. y KILPPER-BÄLZ, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. Int. J. System. Bacteriol., 34: 31-34.
- SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILPPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D. y FISCHER, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov.. System. Appl. Microbiol., 6: 183-195.
- SCOTT, V. N. (1989) Interactions of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. J. Food Prot., 52: 431-435.
- SCOTT, V. N. y TAYLOR, S. L. (1981). Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. J. Food Sci., 46: 117-120.
- SEELYE, R. J. y YEARBURY, B. J. (1979). Isolation of *Yersinia enterocolitica*-resembling organisms and *Alteromonas putrefaciens* from vacuum-packed chilled beef cuts. J. Appl. Bacteriol., 46: 493-499.
- SEN, N. P., IYENGAR, J. R., DONALDSON, B. A. y PANALAKS, T. (1974). Effect of sodium nitrite concentration on the formation of nitrosopyrrolidine and dimethylnitrosamine in fried bacon. J. Agric. Food Chem., 22: 540.
- SHAHAMAT, M., SEAMAN, A. y WOODBINE, M. (1980). Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. En: "Survival in Extremes of Environment", pp. 227-237. G. W. Gould y E. L. Corry (eds.). Academic Press, London.
- SHAHANI, K. M., VAKIL, J. R. y KILARA, A. (1976). Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus* I. Cultural conditions for the production of antibiosis. Cult. Dairy Prod. J., 11: 14-17.

- SHAHANI, K. M., FRIEND, B. A. y BAILEY, P. J. (1983). Antitumor activity of fermented colostrum and milk. J. Food Prot., **46**: 385-390.
- SHARPE, M. E. (1979). Identification of the lactic acid bacteria. En: "Identification Methods for Microbiologists", pp. 233-259. F. A. Skinner y D. W. Lovelock (eds.). Academic Press, London.
- SHARPE, M. E. (1981). The genus *Lactobacillus* En: "The Prokaryotes. A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria", pp. 1653-1679. Starr, Stolp, Trüper, Balows y Schlegel (eds.). Springer-Verlag, Berlin.
- SHARPE, M. E., FRYER, T. F. y SMITH, D. G. (1966). Identification Methods for Microbiologists. Part. A, pp. 65-79. Academic Press, New York.
- SHAW, B. G. y HARDING, C. D. (1984). A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. J. Appl. Bacteriol., **56**: 25-40.
- SHAY, B. J. y EGAN, A. F. (1981). Hydrogen sulphide production and spoilage of vacuum-packaged beef by a *Lactobacillus* En: "Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity", pp. 241-252. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian y N. Skovgaard (eds.). Academic Press, London.
- SHELEF, L. A. (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef and liver after storage at 4 and 25 °C. J. Food Prot., **52**: 379-383.
- SIDDONS, R. C. y COATES, M. E. (1972). The influence of the intestinal microflora on disaccharidase activities in the chick. Br. J. Nutr., **27**: 101-104.
- SILVA, M., JACOBUS, N. V., DENEKE, C. y GORBACH, S. L. (1987). Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrob. Agents Chemother., **31**: 1231-1233.

- SLETTER, K. O. y KANDLER, O. (1973). Untersuchungen zur entstehung von DL-milchsäure bei lactobacillen und charakterisierung einer milchsäureracemase bei einigen arten der untergattung *Streptobacterium*. Arch. Mikrobiol., **94**: 221-247.
- SMILEY, M. B. y FRYDER, V. (1978). Plasmids, lactic acid production, and N-acetyl-D-glucosamine fermentation in *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti*. Appl. Environ. Microbiol., **35**: 777-781.
- SMITH, G. C., HALL, L. C. y VANDERZANT, C. (1980). Inoculation of beef steaks with *Lactobacillus* species II. Effect on meat quality characteristics. J. Food Prot., **43**: 842-849.
- SMITH, H. W. (1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. J. Pathol. Bacteriol., **90**: 495-501.
- SMITH, J. L. y PALUMBO, S. A. (1978). Reduction of nitrate in a meat system by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Bacteriol., **45**: 153-155.
- SMITH, J. L. y PALUMBO, S. A. (1981). Microorganisms as food additives. J. Food Prot., **44**: 936-955.
- SMITH, J. L. y PALUMBO, S. A. (1983). Use of starter cultures in meats. J. Food Prot., **46**: 997-1006.
- SMITH, J. L., PALUMBO, S. A., KISSINGER, J. C. y NUHTANEN, C. N. (1975). Survival of *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* in lebanon bologna. J. Milk Food Technol., **38**: 150-154.
- SORRINO, O. J., RODRIGUEZ, J. M., MOREIRA, W. L., FERNANDEZ, M. F., SANZ, B. y HERNANDEZ, P. E. (1991). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. Int. J. Food Microbiol., **13**: 1-10.
- SORRELLS, K. M., ENIGL, D. C. y HATFIELD, J. R. (1989). Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., **52**: 571-573.

- SPELHAUG, S. R. y HARLANDER, S. K. (1989). Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J. Food Prot., **52**: 856-862.
- SPENCER, R. (1969). New procedure for determining the ability of microorganisms to reduce nitrate and nitrite. Lab. Pract., **18**: 1286-1296.
- STAMER, J. R. (1979). The lactic acid bacteria: microbes of diversity. Food Technol., **33**: 60-65.
- SUBRAMANIAN, C. S. y MARTH, E. M. (1968). Multiplication of *Salmonella typhimurium* in skim milk with and without added hydrochlorid, lactic and citric acids. J. Milk Food Technol., **31**: 323-326.
- SWAMINATHAN, B., HARMON, M. C. y MEHLMAN, I. J. (1982). *Yersinia enterocolitica* A review. J. Appl. Bacteriol., **52**: 151-183.
- SWANK, R. T. y MUNKRES, K. D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem., **39**: 462-477.
- SZITA, J., KALI, M. y REDEY, B. (1973). Incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Hungary. Contr. Microbiol. Immunol., **2**: 106-110.
- TAGG, J. R. y MCGIVEN, A. R. (1971). Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol., **21**: 943.
- TAGG, J. R., DAJANI, A. S. y WANNAMAKER, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev., **40**: 722-756.
- TALARICO, T. L., CASAS, I. A., CHUNG, T. C. y DOBROGOSZ, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. Antimicrob. Agents Chemother., **32**: 1854-1858.

- TANAKA, N., TRAISMAN, E., LEE, M. H., CASSENS, R. G. y FOSTER, E. M. (1980). inhibition of botulinum toxin formation in bacon by acid development. J. Food Prot., 43: 450-457.
- TAYLOR, S. L., LEATHERWOOD, M. y LIEBER, E. R. (1978). A survey of histamine levels in sausages. J. Food Prot., 41: 634-637.
- THORNLEY, M. J. y SHARPE, M. E. (1959). Microorganisms from chicken meat related to both lactobacilli and aerobic sporeformers. J. Appl. Bact., 22: 368-376.
- TORTUERO, F., BRENES, A. y RIOPEREZ, J. (1975). The influence of intestinal (cecal) flora on serum and egg yolk cholesterol levels in laying hens. Poultry Sci., 54: 1935-1938.
- TREVORS, J. T. (1985). Plasmid curing in bacteria. FFMS Microbiol. Rev., 32: 149-157.
- UPRETI, G. C. y HINDSILL, R. D. (1973). Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Chemother., 4: 487-494.
- UPRETI, G. C. y HINDSILL, R. D. (1975). Production and mode of action of lactocin 27. Antimicrob. Agents Chemother., 7: 139-145.
- VANKOVA, J. (1957). Motile catalase producing strains of *Lactobacillus delbrueckii*. Nature, 179: 204.
- VESCOVO, M., MORELLI, L. y BOTTAZZI, V. (1982). Drug resistance plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. Appl. Environ. Microbiol., 43: 50-56.
- VIGNOLO, G. M., PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. y OLIVER, G. (1988). Acid production and proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry sausages. J. Food Prot., 51: 481-484.

- WADE, S., CORTIER, G., MOREAU, L. y BESNIER, M. O. (1984). L'ingestion de yaout vivant modifie-t-elle la réponse immunitaire?. IDF Bulletin, 79, 1.
- WALSH, P. M. y MCKAY, L. L. (1981). Recombinant plasmid associated with cell aggregation: high frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML3. J. Bacteriol., 146: 937-944.
- WATKINS, B. y MILLER, B. F. (1983). Competitive gut exclusion of avian pathogens by *Lactobacillus acidophilus* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci., 62: 1772-1777.
- WATKINS, B., MILLER, B. F. y NEIL, D. H. (1982). In vivo inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* against pathogenic *Escherichia coli* in gnotobiotic chicks. Poultry Sci., 61: 1298-1305.
- WEST, C. A. y WARNER, P. J. (1988). Plantaricin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS Microbiol. Lett., 49: 163-165.
- WESTERFIELD, W. W. (1945). A colorimetric determination of blood acetoin. J. Biol. Chem., 161: 495-502.
- WESTHOFF, D. C. y ENGLER, T. (1972). The fate of *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in cottage cheese whey. J. Milk Food Technol., 36: 19-22.
- WHITING, G. C. (1975). Some biochemical and flavour aspects of lactic acid bacteria in ciders and other alcoholic beverages. En: "Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food", pp. 69-85. J. C. Carr, C. V. Cutting y G. C. Whiting (eds.). Academic Press, London.
- WHITTENBURY, J. R. (1963). The use of soft agar in the study of conditions affecting the use of fermentable substrates by lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol., 32: 375-384.
- WHITTENBURY, J. R. (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J. Gen. Microbiol., 35: 13-26.

- WILKINSON, B. J. y JONES, D. (1977). A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. J. Gen. Microbiol., 98: 399-421.
- WISEMAN, D. W. y MARTH, E. H. (1981). Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis* Mycopathologia, 73: 49-56.

